

**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Departamento de Biología**  
**Doctorado en Biología**



**CÉLULAS MESENQUIMALES Y ENCEFALOMIELITIS  
AUTOINMUNE EXPERIMENTAL: PATRONES DE  
CIRCULACIÓN CELULAR Y EFECTO DEL CANNABIDIOL**

Autor:  
**Ruth García Hernández**

**Tesis doctoral**

Madrid, 2019

**Facultad de Biología**  
**Departamento de Biología**  
**Universidad Autónoma de Madrid**



Tesis Doctoral

**Ruth García Hernández**

Licenciada en Biología

Directores:

**Dr. Juan Antonio García Merino**

**Dr. Antonio José Sánchez López**

Tutor:

**Dr. Enrique Turiégano Marcos**

Unidad de Neuroinmunología

Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana

Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda

**2019**

Si he visto más lejos que otros,  
es porque estaba sobre los hombros de gigantes.

Isaac Newton.

## **Dedicatoria**

A mis padres, mi hermano y mi marido que son los pilares de mi vida.



**Aprobación del estudio y fuentes de financiación**

La Tesis Doctoral titulada “Células mesenquimales y encefalomiелitis autoinmune experimental: patrones de circulación celular y efecto del cannabidiol” llevada a cabo por Dña. Ruth García Hernández ha sido desarrollada dentro de un proyecto de investigación llamado “Células mesenquimales y encefalomiелitis autoinmune experimental: patrones de circulación celular y efecto del cannabidiol” que ha sido financiado en su mayoría por el proyecto PI12/02672 del Fondo de Investigación Sanitaria FIS integrado en el Plan Nacional de I+D+I financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y cuyo investigador principal es el Dr. Juan Antonio García Merino. Adicionalmente se han usado para este proyecto fondos de la “Beca de Investigación en esclerosis múltiple Fundación Genzyme” (23379).

Debido al uso de animales en el desarrollo del proyecto se solicitó autorización a la Comunidad de Madrid (CAM), la cual se adjunta en este manuscrito como anexo 2.

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Juan Antonio García Merino y al Dr. Antonio José Sánchez López por la dirección de esta tesis. Antonio, gracias por sembrar en mí la semilla de la curiosidad investigadora que da sus frutos años después. Tus conocimientos y enseñanzas, han marcado y marcarán el devenir de mi vida profesional. Te agradezco también el haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo esta tesis.

Antoñuco, mi revisor más crítico, tus feroces correcciones han dado solidez y coherencia a este trabajo, nunca podré agradecértelo lo suficiente. Las tardes de revisión y diseño de experimentos siempre “darán una vuelta” en mi cabeza.

También me gustaría agradecer al Dr. Enrique Turiégano Marcos, por la tutoría de esta tesis y la ayuda prestada siempre que lo he necesitado. Al Dr. Manuel Pardo de Santayana por solventar mis dudas y siempre facilitar las tareas administrativas, pero sobre todo por dedicarle tiempo a la lectura de esta tesis.

A todo el equipo del laboratorio de Neuroinmunología, Irene, Alicia, Coral, Inés y Lucía por su ayuda y todos los momentos que hemos pasado juntas. En especial, quería agradecerle a Irene por tu buena disposición, tu ayuda y tu compañía, que se han transformado en una sincera amistad y por contagiarme esa alegría y energía que tanto te caracterizan.

A Arantxa García Grande, por tu paciencia y saber estar, por dedicarme tu bien más preciado: tu tiempo, por tus píldoras de sabiduría y, sobre todo, por tu amistad. A Mari, por ayudarme, escucharme y por formar parte de este trabajo. A Elvira, por tu tesón y buen hacer. A las tres, por las revisiones que dejaron valiosos comentarios.

A Silvia, por tus buenos consejos y animarme siempre a continuar. Y a todos los laboratorios vecinos, sois muchos para nombraros, pero me gustaría destacar el compañerismo y el apoyo en momentos bajos de Marta (por transmitirme siempre serenidad), Rocío (por entenderme tanto), Antonio (mi suministrador de nitrógeno), Ana García (por siempre estar dispuesta a ayudarme fuese cual fuese la tarea) *et al.*

A todos los miembros del animalario y, principalmente, a Carmen, sin tu ayuda todo hubiese sido mucho más difícil. Gracias por esos bailes en el animalario, por las risas, por los buenos momentos que hemos pasado juntas y por tu ayuda desinteresada.

También a los compañeros de la Fundación, en especial a Nacho, por abastecerme de galletas en las horas de hipoglucemia y saber siempre qué decir para sacarme una sonrisa.

A todos los compañeros de consultas por preocuparse siempre por mí. A Pedro, por tus buenos consejos y los cafés de máquina. A Ofir por quererme y cuidarme tanto. A Charo por mostrarme otra visión. A Julia, la neuróloga más dulce del Puerta, amiga gracias por tus abrazos. A Esther, por tu apoyo incondicional.

Al grupo de biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP-CSIC), por la cesión de las nanos, sin ellas parte de este trabajo no hubiese

sido posible. Y al laboratorio de imagen del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por estar siempre dispuestos a tenderme la mano.

También a Ana Royuela, por hacerme siempre hueco para realizar los análisis estadísticos de esta tesis.

No puedo dejar de agradecer a mis amigos (Mária, Irene, María, Ángela, Carol, Merche, Miri, Gonza, Joselín, Charlie, Bea...) por aguantarme durante estos años, adaptaros a mis horarios y, animarme siempre a continuar con este proyecto.

A mis padres y mi hermano, de vosotros he aprendido el significado del esfuerzo, sacrificio, bondad, el amor y el apoyo incondicional, gracias por alegraros de mis logros y desvelaros por mis caídas.

A Jesús, mi compañero de vida, gracias por estar estos años a mi lado, por aguantarme, apoyarme y quererme. Por no dejarme tirar la toalla, por tus lecciones de informática y porque una parte de esta tesis también lleva tu nombre.

## RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es la causa más común de discapacidad neurológica en adultos jóvenes. Es una enfermedad crónica, inflamatoria y neurodegenerativa, mediada por el sistema inmune que se caracteriza por la presencia de inflamación, desmielinización y daño axonal en el sistema nervioso central (SNC). La terapia actual de la enfermedad ha avanzado notablemente, disponiéndose de medicamentos cada vez más eficaces, pero aún no existe una terapia existosa que controle la fase degenerativa.

La terapia con células madre mesenquimales (MSC) ofrece un gran atractivo en EM, por sus efectos inmunomoduladores y neuroprotectores. Este trabajo pretende aclarar ciertos aspectos sobre la influencia de las MSC en las células encefalitógenas causantes del daño tisular en el modelo animal de esclerosis múltiple: encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). También hay indicios del papel inmunomodulador del cannabidiol (CBD) y su capacidad antiinflamatoria, que podrían influir en la mejoría de la clínica de la EAE de transferencia pasiva (TA-EAE). Asimismo, se investigó el papel del CBD sobre el comportamiento de las MSC y el posible sinergismo de ambos tratamientos.

El estudio *in vitro* mostró que tanto las MSC como el CBD disminuyeron la viabilidad de células encefalitógenas. Además, se observó un efecto beneficioso del CBD sobre las MSC, las cuales potenciaron sus propiedades antiinflamatorias.

Los hallazgos encontrados en el estudio *in vivo*, realizado en el modelo de TA-EAE en ratones C57BL/6, evidenciaron que tanto el CBD como las MSC produjeron una disminución de los signos clínicos de la enfermedad, siendo más acusado el efecto del CBD. Se encontró un efecto terapéutico añadido del CBD sobre el tratamiento con MSC en TA-EAE. Además, se completó este estudio analizando la influencia de estos tratamientos sobre parámetros clínicos, radiológicos e histológicos en animales tratados con MSC, CBD y la combinación de ambos.

Dada la importancia de los estudios preclínicos y diversidad en los protocolos de inducción para el modelo TA-EAE, se profundizó sobre factores que podían influir en el desarrollo del mismo, tales como, tiempo de inoculación de las células encefalitógenas, concentración de antígeno y distintas combinaciones de citocinas. Se observó, para una inducción óptima, la necesidad de un tiempo mínimo de activación celular, una cantidad determinada de MOG<sub>35-55</sub> y que la adición de IL-18 al cultivo potenciaba la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro*, que se reflejaba en una puntuación clínica más alta, acompañada de mayor infiltración, grado de desmielinización y daño axonal, resultando un modelo más potente y homogéneo.

Hasta la fecha el patrón circulatorio de las células encefalitógenas y las MSC es desconocido en la variedad pasiva de la EAE. Para estudiar su biodistribución se inocularon células encefalitógenas marcadas con nanopartículas IR-820 nm Fe<sup>2+</sup> para inducir la enfermedad y MSC infectadas con lentivirus-GFP como tratamiento. La biodistribución de estas células se analizó mediante microscopía

confocal, PCR y resonancia magnética (RM). Los resultados mostraron células encefalitógenas marcadas a día 1, 2 y 3 p.i en cerebro, médula, ganglios y bazo. Estos hallazgos sugieren que las células encefalitógenas activadas atraviesan la barrera hematoencefálica rápidamente tras su inoculación, y desencadenan la respuesta inflamatoria que producirá la clínica característica de la TA-EAE. En el caso de las MSC-GFP, se localizaron en médula espinal a día 16 p.i, lo que muestra que serían capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica y dirigirse a zonas de inflamación del SNC.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is the most common cause of neurological disability in young adults. It is a chronic, inflammatory and neurodegenerative disease, mediated by the immune system that is characterized by the presence of inflammation, demyelination and axonal damage in the central nervous system (CNS). The current therapy of the disease has advanced significantly, with increasingly effective medications available, but there is still no successful therapy to control the degenerative phase.

Mesenchymal stem cell therapy (MSC) offers great attractiveness in MS, due to its immunomodulatory and neuroprotective effects. This paper aims to clarify certain aspects of the influence of MSCs on the encephalitogenic cells that cause tissue damage in the multiple sclerosis animal model: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). There are also indications of the immunomodulatory role of cannabidiol (CBD) and its anti-inflammatory capacity, which might influence clinical improvement in EAE of passive transfer (at-EAE). In addition, we investigated the role of CBD in the behaviour of MSCs and the possible synergism of both treatments.

The *in vitro* study showed that both, MSCs and CBD, decreased the viability of encephalitogenic cells. In addition, a beneficial effect of CBD on MSCs was observed, enhancing their anti-inflammatory properties.

The findings of the *in vivo* study, performed in the at-EAE model in C57BL/6 mice, showed that both, CBD and MSC, produced a decrease in the clinical signs of the disease, being the effect of CBD more pronounced. A side therapeutic effect of CBD was found on treatment with MSC in at-EAE. In addition, this study was completed analysing the influence of these treatments on clinical, radiological and histological parameters in animals treated with MSC, CBD or the combination of both.

Due to the importance of preclinical studies and the diversity of protocols for the induction of the at-EAE model, we aimed to study factors that might influence the development of the disease, such as inoculation time of the encephalitogenic cells, antigen concentration and different combinations of cytokines. We observed that a minimum time of cellular activation, the MOG<sub>35-55</sub> concentration and the addition of IL-18 to the culture were key factors for an optimal at-EAE induction. These factors potentiated the production of IFN- $\gamma$  *in vitro*, which was reflected in a higher clinical score, accompanied by greater inflammation, degree of demyelination and axonal damage, resulting in a more powerful and homogeneous model.

Currently, the circulatory pattern of encephalitogenic cells and MSCs is unknown in the passive variety of EAE. To study their biodistribution, encephalitogenic cells labeled with IR-820nm Fe<sup>2+</sup> nanoparticles were inoculated to induce the disease, and MSCs were infected with lentivirus-GFP as treatment. The biodistribution of these cells was analysed by confocal microscopy, PCR and magnetic resonance imaging. The results showed the presence of encephalitogenic cells at days 1, 2 and 3 p.i in brain, spinal cord, ganglia and spleen. These findings suggest that

activated encephalitogenic cells cross the blood-brain barrier rapidly after inoculation, and trigger the inflammatory response that will produce the clinical characteristics of at-EAE. In the case of the MSC-GFP, they were located in the spinal cord at day 16 p.i., which shows that those cells were able to migrate across the blood-brain barrier towards the areas of inflammation in the CNS.

## ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

2-AG	2- araquidonilglicerol
Δ9-THC Δ9	Tetrahidrocannabinidiol
ACK	Tampón de Lisis Amoniaco-Cloruro-Potasio ( <i>Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer</i> )
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AEA	Anandamida
APC	Células Presentadoras de Antígeno
BHE	Barrera Hematoencefálica
CBD	Cannabidiol
CB <sub>1</sub>	Receptor de Cannabinoides 1 (Cannabinoid Receptor Type 1)
CB <sub>2</sub>	Receptor de Cannabinoides 2 (Cannabinoid Receptor Type 2)
CDA	Coeficiente de Difusión Aparente
CFA	Adyuvante Completo de Freund ( <i>Complete Freund's Adjuvant</i> )
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride marcador nuclear
DC	Células dendríticas ( <i>dendritic cells</i> )
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethyl Sulfoxide</i> )
DPI	Días Post Inmunización
EAE	Encefalomiелitis autoinmune (o alérgica) experimental
EDTA	Ácido Etildiaminotetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> )
EM	Esclerosis Múltiple
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GPR55	Receptor Acoplado a Proteína G 55 ( <i>G Protein Coupled Receptor 55</i> )
HA	Hidroxiapatita Inorgánica
HBSS	Solución Salina Equilibrada de Hank ( <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> )
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
i.v	Vía Intravenosa
i.p	Vía Intraperitoneal
p.i	Post-inoculación
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular ( <i>International Society of Cellular Therapy</i> )
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MBP	Proteína básica de mielina ( <i>Myelin Basic Protein</i> )
MOG <sub>35-55</sub>	Glicoproteína Mielínica de Oligodendrocitos ( <i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i> )
MSC	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea ( <i>Mesenchymal Stem Cells bone marrow</i> )
MSC-GFP	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea infectadas con Lentivirus GFP
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5- Difenil Bromuro de Tetrazolio
NK	Células Citotóxicas Naturales ( <i>Natural Killer Cells</i> )
NO	Óxido Nítrico



NP	Nanopartículas
NT	Neurotransmisores
O.C.T	Temperatura de Corte Óptima ( <i>Optimal Cutting Temperature</i> )
p.i	Post-inoculación
PBS	Buffer Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
qPCR	PCR cuantitativa
RM	Resonancia magnética
ROIs	Regiones de interés
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
SBF	Suero Fetal Bovino ( <i>Serum Bovine Fetal</i> )
Sca-1	<i>Stem cell antigen-1</i>
SNC	Sistema nervioso central
TA-EAE	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental inducida por Transferencia Adoptiva o pasiva
TGF-β1	Factor de Crecimiento Transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TP	Toxina Pertussis
TRPV1	Receptor vanilloide
UFC	Unidades Formadoras de Colonias ( <i>Colony-Forming Units</i> )
VEB	Virus de Epstein-Barr

# ÍNDICE

## Contenido

<b>RESUMEN .....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVII</b>
<b>ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....</b>	<b>1</b>
1.1 Definición, sintomatología y diagnóstico .....	1
1.2 Etiología: factores genéticos y ambientales .....	2
1.3 Epidemiología .....	3
1.4 Tratamientos.....	4
<b>2. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y PATOGÉNESIS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....</b>	<b>5</b>
<b>3. ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>6</b>
<b>4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....</b>	<b>8</b>
<b>5. CANNABINOIDES .....</b>	<b>11</b>
5.1 Historia.....	11
5.2 Sistema cannabinoide .....	12
5.3 Ligandos de los receptores cannabinoides .....	12
5.4 Receptores de cannabinoides .....	14
5.5 Mecanismos de acción .....	15
5.6 Esclerosis múltiple y cannabinoides.....	16
<b>6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>2. INDUCCIÓN DE EAE ACTIVA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS .....</b>	<b>21</b>
<b>4. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (TA-EAE) .....</b>	<b>22</b>
<b>5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN .....</b>	<b>22</b>

6.	INMUNOFENOTIPADO DE MSC.....	23
7.	DIFERENCIACIÓN TRILINEAR DE MSC.....	24
8.	CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES CB <sub>1</sub> , CB <sub>2</sub> Y GPR55 EN MSC Y CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS. ....	25
9.	EFFECTO <i>IN VITRO</i> DE CBD SOBRE LAS MSC Y CÉLULAS T ENCEFALITÓGENAS.....	26
10.	TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> CON MSC .....	26
11.	TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> CON CBD.....	26
12.	RESONANCIA MAGNÉTICA DE LOS RATONES INDUCIDOS A TA-EAE .....	27
13.	HISTOLOGÍA .....	27
13.1	Extracción y procesamiento de las muestras biológicas .....	27
13.2	Inclusión en los Bloques OCT.....	27
13.3	Inmunofluorescencia .....	27
13.4	Tinción de Hematoxilina y Eosina .....	28
14.	OPTIMIZACIÓN DEL MODELO TA-EAE.....	28
15.	MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES MARCADAS CON GFP (MSC-GFP) ...	29
15.1	Infección de MSC con lentivirus- GFP .....	29
15.2	Biodistribución MSC-GFP en animales control .....	30
15.3	Detección de MSC-GFP mediante PCR cuantitativa .....	31
15.4	Estudio histológico.....	32
15.5	Biodistribución MSC-GFP en animales TA-EAE .....	32
16.	MONITORIZACIÓN DE LAS CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS EN ANIMALES TA-EAE .....	32
16.1	Monitorización del Cromosoma Y .....	32
16.2	Monitorización mediante Nanopartículas IR-820 nm Fe <sup>2+</sup> .....	33
17.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35
	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
1.	<b>MODELO ANIMAL.....</b>	<b>37</b>
1.1	Inducción de EAE activa .....	37
1.2	Células encefalitógenas e inducción EAE pasiva.....	37
2.	<b>CÉLULAS MESENQUIMALES DE RATONES C57BL/6 .....</b>	<b>38</b>
2.1	Aislamiento, cultivo y expansión de las MSC.....	38
2.2	Inmunofenotipado.....	38
2.3	Transformación trilinear (tejido adiposo, cartílago y hueso) .....	39
3.	<b>TRATAMIENTOS CON CBD Y MSC .....</b>	<b>40</b>
3.1	Estudios <i>in vitro</i> .....	40
3.1.1	Caracterización de los receptores CB <sub>1</sub> , CB <sub>2</sub> y GPR55 en células encefalitógenas y MSC.....	40

3.1.2 Efecto in vitro de CBD sobre células encefalitógenas y MSC .....	41
3.2 Transformación trilinear MSC y efecto del CBD .....	43
<b>4. TRATAMIENTO CON MSC Y CBD: ELECCIÓN DE DOSIS Y DÍAS DE TRATAMIENTO .....</b>	<b>44</b>
<b>5. EFECTO DE CBD Y MSC EN EL MODELO TA-EAE .....</b>	<b>46</b>
5.1 Evaluación de la escala clínica .....	46
5.2 Resonancia magnética de los ratones con TA-EAE .....	48
5.3 Histología .....	51
<b>6. MEJORA DEL MODELO TA-EAE .....</b>	<b>55</b>
<b>7. BIODISTRIBUCIÓN MSC .....</b>	<b>61</b>
7.1 Infección de MSC de ratón C57BL/6 con lentivirus-GFP .....	61
7.2 Biodistribución de MSC-GFP en animales control .....	62
7.3 Biodistribución de MSC-GFP en animales TA-EAE .....	63
<b>8. BIODISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS EN ANIMALES TA-EAE .....</b>	<b>64</b>
8.1 Marcaje de células encefalitógenas.....	64
8.2 Biodistribución de células encefalitógenas IR-820 nm Fe <sup>2+</sup> .....	66
8.3 Efecto de las nanopartículas IR-820 nm Fe <sup>2+</sup> en las células encefalitógenas.....	68
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>112</b>

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

### 1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

#### 1.1 Definición, sintomatología y diagnóstico

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria, desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) que afecta a casi 2,5 millones de personas en todo el mundo según datos de la OMS. Es la principal causa de discapacidad neurológica en adultos jóvenes, (Karussis., 2014), después de los accidentes de tráfico. Fue el neurólogo Charcot en 1868 quien realizó una primera descripción detallada de los aspectos clínicos de la enfermedad y quien acuña el concepto de esclerosis en placas diseminadas, aludiendo a los hallazgos anatomopatológicos.

La EM afecta a individuos de todas las edades, pero un 70% de los casos se declaran entre los 20 y 40 años, siendo la edad media de máxima incidencia alrededor de los treinta años. Es una enfermedad que afecta a mayor número de mujeres que hombres en una proporción aproximada de dos a tres veces (Koch-Henriksen y Sørensen., 2010; Bove y cols., 2015), una explicación a este fenómeno podría estar relacionada con factores hormonales (Duquette y cols., 1992).

Se acepta que uno de los mecanismos que dan lugar a la EM es la activación de linfocitos autorreactivos dirigidos contra la mielina del SNC donde causan inflamación, desmielinización, pérdida axonal y neuronal y formación de lesiones en placa en la sustancia gris y blanca, las cuales se diseminan tanto en el tiempo como en el espacio (Popescu y cols., 2012).

Los síntomas son de naturaleza diversa y dependen de dónde estén situadas las placas en el SNC (Cohen y Rae-Grant., 2012; Deangelis y Miller., 2014).

El inicio de la EM y su curso clínico son heterogéneos y varían de un paciente a otro e incluso, en un mismo paciente a lo largo del tiempo. La enfermedad empieza antes de que se manifiesten los síntomas, cuando los mismos aparecen, ya existen evidencias de alteraciones en cerebro y médula espinal. En su forma mayoritaria y que afecta a aproximadamente un 85 % de los pacientes, la enfermedad comienza en forma de brotes desmielinizantes aislados, seguidos de remisiones parciales o totales (Lublin y cols., 2014). Esta etapa inicial se llama esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR) y es en ella en la que mejor responden los pacientes a los tratamientos disponibles. Tras este primer periodo, puede evolucionar, presentando un deterioro neurológico progresivo, independientemente de brotes y remisiones. A esta etapa se le denomina esclerosis múltiple secundariamente progresiva (EMSP) y la respuesta a los tratamientos disponibles es limitada (Lublin., 2014; Confavreux y Vukusic., 2014). Hay un grupo reducido de pacientes, en los que desde el momento del diagnóstico la

enfermedad cursa con progresión, se trata de la esclerosis múltiple primariamente progresiva (EMPP) (Sung y cols., 2012). Considerando los nuevos criterios diagnósticos de EM (Thompson y cols., 2017) hay que tener en cuenta el síndrome desmielinizante aislado o CIS (en inglés *Clinically Isolated Syndrome*), que consiste en la aparición la evidencia clínica de un primer brote típico de EM en una persona que no ha sido diagnosticada de EM. Según los mismos autores este primer episodio puede ser clasificado como EM si se dan una serie de características en la resonancia magnética (RM) que evidencien la diseminación en el tiempo y en el espacio, necesarias para el diagnóstico de EM. (Brownlee y cols., 2017).

## 1.2 Etiología: factores genéticos y ambientales

Actualmente se desconoce la etiología de la EM, pero se cree que es multifactorial y se desencadena por determinados factores ambientales en individuos que estarían genéticamente predispuestos, dando lugar a una respuesta autoinmune que provocaría la lesión del SNC (Brosnan y cols., 1996).

Por un lado, se encuentran los factores genéticos; estudios epidemiológicos muestran que estos afectan a la susceptibilidad de la EM. Tienen a su favor hechos tales como, diferencias raciales en la frecuencia de EM, existencia de grupos étnicos resistentes a padecerla a pesar de las migraciones, agregación familiar demostradas, concordancia en gemelos monocigóticos en torno a un 30% frente a un 5 % de gemelos dicigóticos y asociación con determinados haplotipos del antígeno leucocitario humano (Mitrovič y cols., 2018).

Pero estos resultados no explican por completo la susceptibilidad a padecer EM (Sadovnick y cols., 1993; Willer y cols., 2003), por lo que hay que considerar factores ambientales de riesgo, que contribuyan al desarrollo de esta patología. Entre los mismos se encuentran:

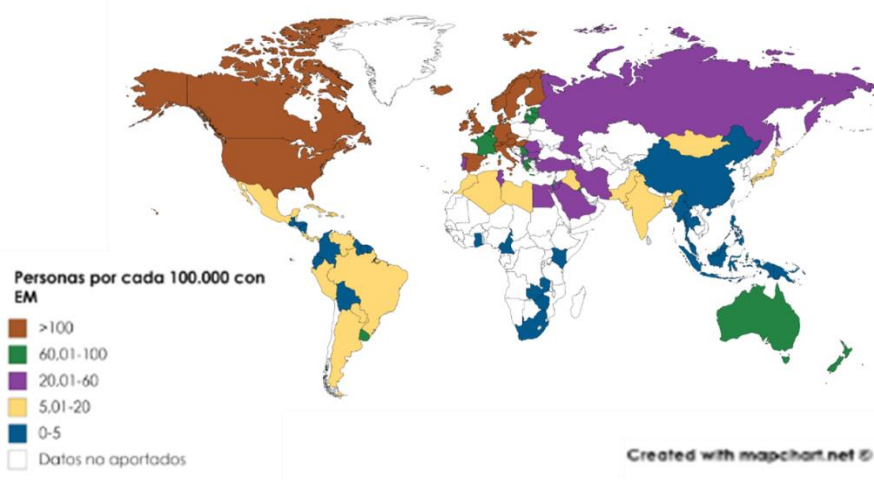
- Tabaquismo: la asociación entre el consumo del tabaco y la EM es unánime en todos los estudios y es de los pocos factores que son considerados de riesgo con una fuerte evidencia científica (Belbasis y cols., 2015).
- Virus de Epstein-Barr: es un virus con elevada prevalencia en la población general, siendo del 90%, mientras que en los pacientes de EM la prevalencia es casi del 100% y los títulos de anticuerpos son más amplios. (Serafini y cols., 2007). La mononucleosis infecciosa y la EM muestran una distribución geográfica semejante, y algunos estudios revelan una prevalencia de la EM diez veces mayor en pacientes que habían padecido mononucleosis en la niñez (Ascherio y Munger, 2007).
- Vitamina D: esta vitamina interviene en múltiples mecanismos de regulación del sistema inmunológico, tales como proliferación y diferenciación de linfocitos, maduración de células dendríticas y respuesta antígeno específica (Tavera-Mendoza., 2007). Ciertos estudios vinculan niveles bajos de vitamina D, comunes en pacientes de EM, con los niveles de radiación UV, aunque otros estudios creen que se tratan de factores independientes (Lucas y cols., 2011; Talavera Hernández y cols., 2013).
- Consumo de sal: los niveles de sal elevados en la dieta inducen la proliferación de los linfocitos Th17 y estos producen un aumento de síntesis de citocinas proinflamatorias

(Kleinewietfeld y cols., 2013), lo que podría relacionarse con un incremento en el riesgo de EM (Hucke y cols., 2016).

-Microbiota intestinal: hay estudios que relacionan la flora intestinal con el desarrollo de EM. Se ha comprobado que ratones carentes de la microbiota son resistentes a EAE (Lee y cols., 2010). Otros estudios epidemiológicos comparan pacientes de EM con población sana, mostrando diferencias significativas en la composición de la microbiota. En concreto se ha visto un mayor porcentaje de *Archaea* y menor de *Clostridium perfringens*, *Firmicutes* y *Butyricimonas* en pacientes de EM. Tanto *Firmicutes* como *Butyricimonas* son productoras de butirato, sustancia con acción antiinflamatoria (Mielcarz y cols., 2015). Hay múltiples estudios con resultados prometedores, pero hasta el momento no hay evidencias necesarias para indicar el uso de probióticos como tratamiento complementario de la EM (Mielcarz y cols., 2015). A pesar de todos los estudios epidemiológicos, según los estudios de metaanálisis realizados por Belbasis en 2015, los únicos 3 factores que cumplían los requisitos para ser considerados inequívocamente factores de riesgo son: la seropositividad en los anticuerpos contra el VEB (virus de Epstein Barr) tipo IgG, la mononucleosis infecciosa y el tabaquismo.

### 1.3 Epidemiología

La prevalencia no es homogénea, y hay variaciones considerables de unas zonas geográficas a otras como se muestra en la **figura 1**. La media de prevalencia mundial de la EM es de 33/100.000. La prevalencia de EM es baja en las regiones próximas al ecuador, y aumenta con la latitud en Europa y América del Norte donde, la tasa es >100/100.000. La tasa de prevalencia en latitudes bajas, este de Asia y el África subsahariana es de ~2/100.000. Se estima que la incidencia anual de EM en Europa es de 4.3/100.000 (Pugliatti y cols., 2006). Estas diferencias podrían explicar una susceptibilidad genética, pero otra causa podría ser los factores socioeconómicos que no permitiesen un diagnóstico correcto (Koch-Henriksen y cols., 2010), y el patrón de vida occidental (polución, consumo de tabaco, uso de protecciones solares). Otros autores lo relacionan con la distribución de la radiación solar, como se mencionó anteriormente, y con la teoría de la higiene, la cual explica que la prevalencia de las enfermedades autoinmunes ha aumentado en sentido inverso al descenso de las infecciones durante la infancia (Rook., 2012).



**Figura 1. Mapa de prevalencia de la EM en el mundo correspondiente al año 2013 (Atlas de EM).** El mapa fue diseñado usando el programa Mapchart disponible de forma gratuita en la página <https://mapchart.net/detworld.html>. Los datos han sido obtenidos del Atlas de EM 2013 (Browne y cols., 2013).

## 1.4 Tratamientos

En el proceso patológico de la EM se diferencian dos fases: inflamatoria y degenerativa. La meta sería desarrollar terapias eficaces que regulasen la respuesta inflamatoria y al mismo tiempo evitasen la degeneración axonal. La terapia de primera línea para EMRR está formada por Interferones beta y el acetato de glatirámico que son inmunomoduladores, pero su eficacia es parcial. Los interferones modulan el perfil de citocinas hacia un perfil Th2 (antiinflamatorio), reducen la migración de las células inflamatorias a través de la barrera hematoencefálica (BHE) dañada porque bloquean moléculas de adhesión y disminuyen los niveles de citocinas proinflamatorias (Praksova y cols., 2012). Mientras que el acetato de glatirámico mimetiza con la proteína básica de la mielina, siendo blanco de los anticuerpos y reduciendo el ataque de estos a las proteínas de la mielina (Arnold y cols., 2013). También forman parte de primera línea de tratamiento el fármaco dimetilfumarato (activador del factor de transcripción antioxidante Nrf2) y la teriflunomida (inhibidora de la síntesis de pirimidinas en las células linfoides proliferativas). La ventaja de estos dos últimos fármacos, respecto de los citados anteriormente es que su administración es oral (Jadidi-Niaragh y cols., 2011).

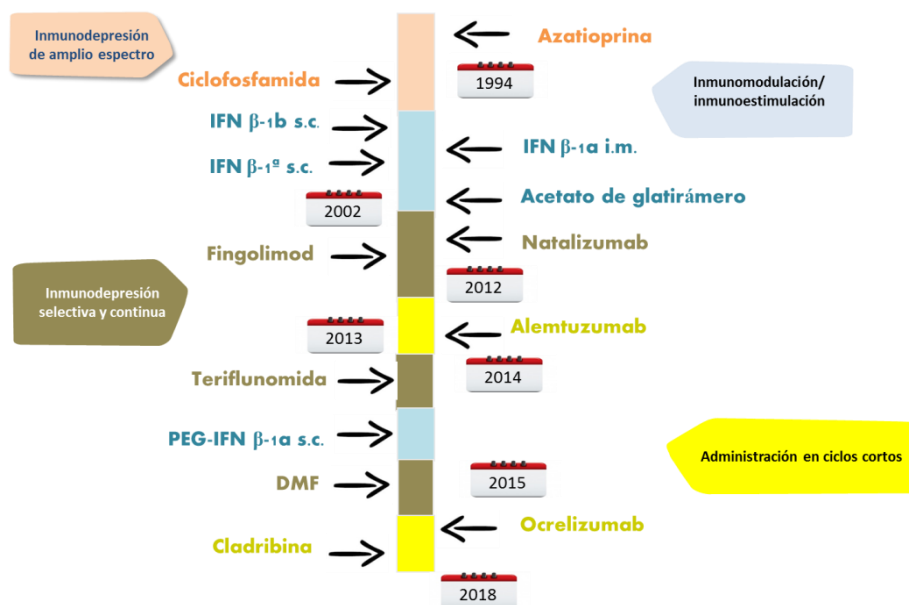
Entre los tratamientos de segunda línea (**figura 2**), se encuentra el fingolimod que es un agonista inverso de receptores esfingosina 1 fosfato que ejerce su acción sobre las células que expresan la molécula de adhesión CCR7 requerida para su salida desde ganglios linfoides a la circulación periférica (Cohen y Chun., 2011). Otro tratamiento de segunda línea es el natalizumab que es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la molécula de adhesión celular VLA-4, bloqueando la migración de linfocitos al SNC (Zivadinov y cols., 2012).

Los últimos tratamientos aprobados han sido el alemtuzumab, la cladribina y el ocrelizumab. El alemtuzumab, que es otro anticuerpo monoclonal que, actúa frente a la molécula de superficie CD52 presente en casi todas las células T, B y NK, siendo estas eliminadas. (García-Merino y cols., 2013). La cladribina es un análogo nucleósido de la desoxiadenosina cuya forma fosforilada, 2clorodesoxiadenosina trifosfato (Cd-ATP), inhibe la síntesis de ADN y la función mitocondrial en los linfocitos T y B en división provocando apoptosis (Singh y cols., 2013; Ceronie y cols., 2018). El ocrelizumab es un anticuerpo humanizado dirigido contra el antígeno de superficie CD20 (Weber y cols., 2010).

El ofatumumab (humano) es otro fármaco dirigido contra antígeno de superficie CD20 (Weber y cols., 2010) y aún se encuentra en ensayo clínico. Siponimod es otro agonista inverso de receptores esfingosina 1 fosfato diseñado para el tratamiento de la forma secundariamente progresiva de EM, pendiente de aprobación en Europa.

Otra línea de desarrollo de terapias serían fármacos neuroprotectores, como el anti-LINGO1, un anticuerpo humanizado que promueve la remielinización y que aún se encuentra en estudio (Tran y cols., 2014). Además, existen nuevas terapias para el tratamiento sintomático de la enfermedad, como es el caso del nabiximols (THC/CBD) para el control de la espasticidad (Moreno y cols., 2014) y la fampridina que mejora la marcha (Goodman y cols., 2009).



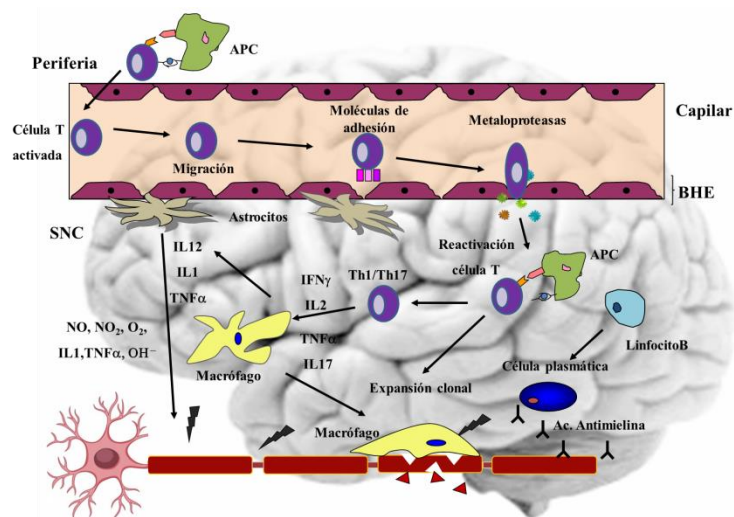


**Figura 2. Fármacos modificadores de la enfermedad empleados actualmente para tratamiento de EM.** Se muestra el año de aprobación para su uso y el efecto de los mismos. (Hart y Bainbridge, 2016; Cree y cols., 2019).

## 2. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y PATOGÉNESIS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El SNC es considerado como un área con privilegios inmunológicos, debido a que el paso de determinadas moléculas de gran tamaño y células desde la circulación periférica es muy selectivo (Wilson y cols., 2010; Engelhardt y Coisne., 2011), comparado con lo que sucede en otros órganos. El concepto de privilegio inmune viene dado por la aparente diferencia entre las respuestas inmunes en SNC y en tejidos periféricos. Este privilegio se debe a la existencia de la BHE, que está formada por células endoteliales cerebrales, pericitos y su lámina basal, que se encuentran envueltos y apoyados por astrocitos y macrófagos perivascuales.

La función de la BHE es mantener la homeostasis cerebral y en situación normal las células T activadas atraviesan la BHE para realizar una vigilancia inmunológica en el espacio subaracnoideo y espacio perivascular, pero su entrada está limitada y el tráfico de sustancias es cien veces menor que en otros órganos, como es el caso de pulmón y bazo (Hickey., 1999). El paso de los linfocitos está mediado por los receptores de adhesión celular que expresan las células endoteliales y factores quimiotácticos (Barreiro y Sánchez-Madrid, 2009). En determinadas situaciones patológicas, como sucede en la EM, las células endoteliales pierden esta función neuroprotectora y los linfocitos que se han activado en periferia, se infiltran a través de la BHE en el SNC, donde se desencadena una respuesta inmune que afecta a la mielina y a los axones dañándoles. A este daño se suma la acción de factores citotóxicos, como citocinas proinflamatorias, las proteasas y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno, que colaboran en la destrucción de la vaina de mielina (Ortiz y cols., 2014). En la **figura 3** se representan las fases del proceso inflamatorio en EM y EAE.



**Figura 3. Fases secuenciales del proceso de la inflamación en EM y EAE.** Durante el proceso inflamatorio que ocurre en EM y en el modelo animal de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), linfocitos T activados en periferia mediante células presentadoras de antígeno (APC) pasan al torrente sanguíneo, migran y a través de moléculas de adhesión y metaloproteasas, se adhieren y atraviesan la BHE. Una vez en el SNC, las células T son reactivadas por células residentes dando lugar a una expansión clonal y una producción de citocinas proinflamatorias, que a su vez activan otros tipos celulares que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y factores inflamatorios que dañan la vaina de mielina. Por su parte los linfocitos B además de funciones cooperadoras con linfocitos T, dan lugar a células plasmáticas que producen anticuerpos antimielina que también dañan la vaina de mielina sumándose al daño inflamatorio (Ortiz y cols., 2014).

En el modelo animal EAE, en el que nos centraremos en el siguiente apartado, se ha visto que se produce una permeabilización de la BHE y ésta se correlaciona con el comienzo del cuadro clínico y la aparición de lesiones histológicas (Juhler y cols., 1984).

Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares que desencadenan esta disfunción en la BHE y el conocimiento de los mismos podría abrir nuevas posibilidades terapéuticas que pudiesen restaurar la regulación de la misma (Petty y cols., 2002; Hiroya y cols., 2015; Greenwood y cols., 2017).

### 3. ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

En 1933 Thomas Rivers y cols. demostraron que tras la inyección de tejido nervioso mielinizado procedente de conejos, producía en *Macacus Rhesus*, de manera regular y reproducible, lo que hoy en día conocemos como encefalomiелitis autoinmune (o alérgica) experimental (EAE) (Rivers., 1935). Años más tarde, Freund elaboró el adyuvante completo que lleva su nombre (CFA), que consistía en una emulsión del “antígeno” acuoso en aceite mineral con bacterias (*Mycobacterium tuberculosis* cepa H37RA) muertas por calor. Al inyectar la misma, la acción del CFA era potenciar, acelerar y mantener la respuesta inmune inducida por el antígeno (Freund., 1951). Posteriormente se descubrió que el antígeno que inducía la patología era la proteína básica de mielina (MBP) que es la proteína mayoritaria en la composición de la mielina (Einstein y cols., 1962). Fue Paterson quien a través de estudios con ratas a las que les

inyectaba células de ganglio linfático reveló que la EAE estaba mediada por células (Paterson., 1960).

Con el propósito de poder ampliar el conocimiento de la EM se han desarrollado multitud de modelos animales, aunque todavía no hay ninguno capaz de mimetizar todas las características de esta enfermedad. Pero sí se ha conseguido representar alguna de ellas de forma individual, lo cual ha conducido a desarrollar nuevas terapias. Entre ellas se encuentran el acetato de glatirámico (Copaxone®) (Teitelbaum y cols., 2004) y el natalizumab (Tysabri®) (Yednock y cols., 1992). También hay que señalar que algunos tratamientos que han funcionado en el modelo animal, no han sido eficaces en el tratamiento de la enfermedad humana. La posible traslación de los resultados obtenidos en los modelos animales a la práctica clínica debe realizarse con precaución. Algunos autores consideran que los hallazgos encontrados en EAE son útiles para el estudio de componentes inmunogenéticos y de características histopatológicas de la EM, pero no lo son tanto para el desarrollo de nuevos fármacos (Mix y cols., 2010).

El modelo más utilizado para el estudio de la EM es la EAE, la cual se define como una enfermedad experimental inducida y mediada por células T antimielina. La EAE comparte características clínicas y patológicas semejantes con la EM. Hay una gran variedad de modelos de EAE que plasman distintos aspectos clínicos, inmunológicos e histológicos de la EM, por lo que la combinación de todos puede dar una visión global de esta enfermedad (Bittner y cols., 2014). Hay distintas formas clínicas de la EAE (aguda, crónica progresiva y recurrente) dependiendo de factores tales como la especie, la cepa usada para inducir la patología, el antígeno utilizado para la inducción y el protocolo de inmunización llevado a cabo (Steinman., 1999). Dependiendo del protocolo de inmunización encontramos los siguientes modelos (Van der Star y cols., 2012):

- Modelos autoinmunes:
  - Activa: inmunizaciones activas con diversas proteínas o péptidos relacionados con la mielina.
  - Pasiva (TA-EAE): inmunizaciones pasivas, por transferencia de células encefalitogénicas, previamente sensibilizadas contra antígenos de la mielina.
  - Espontánea: tras modificaciones genéticas.
- Modelos por infección con virus, como es el caso del virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV).
- Modelos de desmielinización por agentes neurotóxicos, como la cuprizona, el bromuro de etidio y la lisolecitina para producir daño a la mielina.

El modelo más extendido es el llevado a cabo en ratones C57BL/6 mediante inmunización activa, que consiste en una inyección subcutánea (s.c) de la emulsión de péptido MOG<sub>35-55</sub> y CFA, junto con una inyección intraperitoneal (i.p) de toxina pertussis (TP) el día de la inmunización y a las 48 h de la misma. Este modelo es fácilmente reproducible y proporciona resultados fiables (Stromnes y cols., 2006). Hay que tener presente las limitaciones de este modelo. La más importante es que al inmunizar usando

adyuvante y TP se incrementa la respuesta inmunológica. Otra consideración es que al inocular MOG<sub>35-55</sub> esta respuesta está fundamentalmente dirigida por linfocitos T CD4+, pero también hay que considerar la función que tienen los linfocitos CD8+ y las células B en la patogénesis de la EM.

Hace años se pensaba que la EM era una enfermedad mediada exclusivamente por células T CD4+ (Van Kaer y cols., 2019), pero más tarde se vio que las células T CD8+ exhibían una expansión oligoclonal en las placas, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la sangre, lo cual sugiere que tienen un papel deletéreo en la EM (Friese y Fugger, 2009). En EAE también se observó que estas células contribuyen al daño neurológico (Weis y cols., 2007), pero otros trabajos han evidenciado que las células CD8+ desempeñan un papel regulador en el modelo animal, mitigando los efectos de la EAE vía TGF- $\beta$ -dependiente (Chen y cols., 2009).

De la misma manera hay estudios que confirman que las células B también estaban implicadas en la etiopatología de la enfermedad (Van Kaer y cols., 2019). Se ha observado que las células B tienen roles proinflamatorios o antiinflamatorios, según su subtipo y entorno (Dalakas., 2008). De hecho, se han desarrollado fármacos de alta eficacia que actúan frente al antígeno CD20 presente en linfocitos B, como es el caso de ocrelizumab y rituximab, que ya citamos en el apartado de tratamientos. Además, las células del sistema inmunológico, como los macrófagos, las células dendríticas y los mastocitos, se han encontrado en el SNC inflamado (Batoulis y cols., 2010) por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para tratar la EM.

En la TA-EAE se inocular a los animales linfocitos T activados previamente que proceden de otros animales EAE o clones de células T encefalitógenas cultivadas (Zamvil y cols., 1986). En comparación con el modelo activo, los signos clínicos aparecen días antes, y no es necesaria la utilización de CFA, y aunque es una técnica más compleja, una gran ventaja de este modelo es que se pueden variar las condiciones de cultivo de las células encefalitógenas. Se puede caracterizar el fenotipo de estas células y estudiar el papel que ejercen sobre ellas determinadas variables, tales como condiciones de cultivo, agentes biológicos y fármacos antes de su transferencia a los animales receptores. Además, es un modelo de gran utilidad para estudiar la fase efectora de la EAE.

#### 4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre son células no especializadas que poseen la aptitud de proliferar en un estado indiferenciado, o de diferenciarse a otros tipos de células con funciones especializadas (Robey., 2000). En función de su origen se clasifican en células madre embrionarias, hematopoyéticas, neurales, mesenquimales (MSC) y pluripotentes inducidas. La mayoría de las investigaciones se han centrado en las MSC que han adquirido gran relevancia debido a la eficacia y seguridad en los estudios realizados (Xiao y cols., 2015) y a su fácil extracción y expansión *in vitro*, convirtiéndose en una potencial terapia para enfermedades degenerativas.

Fueron Friedenstein y cols quienes descubrieron y aislaron en 1970 las MSC y su microentorno hematopoyético. Dichas células fueron denominadas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFC). Estas células se pueden obtener de la

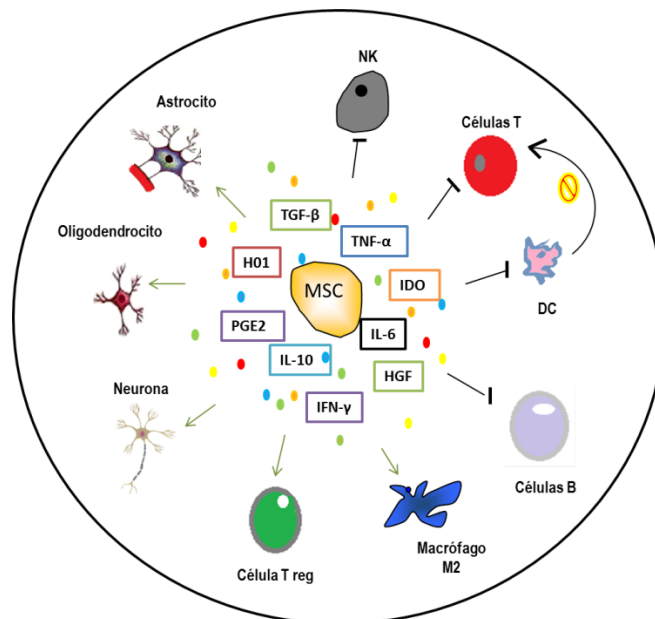
médula ósea (fuente principal), el líquido amniótico, la pulpa dental (Yamada y cols., 2006), el tejido adiposo (Caplan., 1991), el cordón umbilical (Li y cols., 2014), membranas sinoviales y sangre periférica (Roufosse y cols., 2004). Constituyen del 0.01% al 0.001% de todas las células nucleadas de la médula ósea (Salem y Thiernemann., 2010), por lo que es imprescindible su selección y expansión para su posterior uso terapéutico.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés: *International Society of Cellular Therapy*) planteó, en el año 2006, tres criterios para definir las células madre mesenquimales: i) deben ser adherentes en cultivo; ii) expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34 y CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; iii) diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos, en condiciones específicas de cultivo (Dominici y cols., 2006).

Las MSC poseen propiedades inmunosupresoras, inmunomoduladoras, neurotróficas y promotoras de la remielinización (Maltman y cols., 2011), como se muestra en la **figura 4**. Actúan sobre las células T *in vivo* inhibiendo la proliferación de células Th1, la citotoxicidad mediada por CD8 + y activando la producción de células T reguladoras CD4 + antiinflamatorias (De Miguel y cols., 2012). Además, inhiben la diferenciación de células Th17 (Liu y cols., 2015) y favorecen las funciones de los oligodendrocitos, astrocitos y axones (Xiao y cols., 2015). Los efectos inhibidores de las MSC se deben en gran parte a secreción de factores solubles (Rivera y cols., 2006) tales como, IL-6, IL-10, NO (óxido nítrico) (Keating y cols., 2012), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) (Coles y cols., 2008), IFN- $\gamma$  (interferón gamma) (Krampera y cols., 2006), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), prostaglandina E2 (PGE2) (Spaggiari y cols., 2008) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Bai y cols., 2012). La IL-6 tiene un papel importante en la regulación de las células Th17 y T reguladoras. Esta interleucina es producida por las MSC y en su presencia, las MSC dirigen a los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio M2 (caracterizado por una mayor producción de IL-6 e IL-10 y una disminución de la capacidad para inducir la expansión de células Th17), mientras que en su ausencia lo hacen hacia un fenotipo activado M1 (Zhang y cols., 2010). El IFN- $\gamma$ , solo o en combinación con el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-10, induce a las MSC a secretar factores solubles como IDO y PGE2 que modulan la inmunosupresión (Gao y cols., 2016). La IDO disminuye los niveles de triptófano, que, al ser un aminoácido esencial para el desarrollo de los linfocitos, evita que estos proliferen; de esta forma se ha observado la inhibición de linfocitos Th1 productores de IFN- $\gamma$  y, en combinación con PGE2, bloquea las células citotóxicas naturales (NK) (Payne y cols., 2013).

Según el estudio de Bai y cols en 2012 el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) redujo la gravedad de la EAE tras su administración ya que estimuló el desarrollo y la migración de oligodendrocitos y neuronas, redujo la expresión de citocinas proinflamatorias y aumentó la expresión de citocinas antiinflamatorias, además de observarse un aumento de la remielinización. Este mismo estudio propone que el efecto del HGF podría ser alterar permanentemente el equilibrio de las células T pro y antiinflamatorias en la EAE, al influir en la secreción de IL-23 por las células dendríticas (DC).

Tras la administración de MSC en ratones EAE, se ha visto que también modifican la función de las células dendríticas impidiendo que éstas maduren (Benkhoucha y cols., 2010), alterando con ello la presentación de antígenos y, por consiguiente, la expansión clonal de células T reactivas.



**Figura 4. Propiedades de las MSC.** Las MSC ejercen distintas funciones inmunorreguladora e inmunosupresoras, tanto inhibiendo la proliferación de células B, T, DC y NK, como promoviendo efectos antiinflamatorios activando la proliferación de células T reguladoras. Todo ello a través de secreción de factores solubles, como IFN-  $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE2, IDO, IL-10, hemo-oxigenasa-1 (HO1), IL-6 y HGF (Zhang y cols., 2010). Además, pueden modular funciones de astrocitos, oligodendrocitos y axones, ejerciendo papel neuroprotector.

Otra propiedad de las MSC para su uso en terapia es su capacidad de migración a zonas de inflamación, dañadas o tumorales, donde pueden ejercer su función inmunomoduladora (Lee y cols., 2011). En estas zonas afectadas se producen mediadores inflamatorios, lo que dará lugar a que tanto células del sistema inmunológico como MSC se infiltren a estas zonas (Ubogu y cols., 2006), debido a que ambas comparten marcadores de superficie que participan en la migración celular.

El tratamiento con MSC se ha probado en múltiples ensayos clínicos y los resultados son prometedores, además, parecen que son seguros y viables (Ardeshty y cols., 2014). El tratamiento con MSC disminuye el número de lesiones que captan gadolinio (Llufriu y cols., 2014), reduce la puntuación en la escala general de progresión EDSS y mejora en la agudeza visual (Connick y cols., 2012). Otros estudios muestran que las MSC median procesos de reparación del SNC actuando sobre la oligodendrogénesis y la remielinización (Rivera y cols., 2006; Bai., 2007).



## 5. CANNABINOIDES

### 5.1 Historia

*Cannabis sativa* es la única especie vegetal que produce cannabinoides, y es originaria de Asia central y del subcontinente indio. Ha tenido múltiples usos, tanto lúdicos como medicinales desde hace al menos cincuenta siglos (Kalant., 2011). En India era usada para el tratamiento de neuralgias, convulsiones infantiles, calambres y cefaleas. Hay evidencias de que en la medicina tradicional china se empleaba para el tratamiento de la malaria, beri-beri y estreñimiento, describiéndose también sus posibles efectos psicoactivos, denominados “visiones diabólicas” (Touw., 1981). En Inglaterra y en Estados Unidos se utilizaba la denominada tintura de cannabis (extracto alcohólico de resina de cannabis) para el tratamiento de tétanos, rabia, cólera, convulsiones infantiles, reumatismo o deliriums tremens (Mikuriya., 1969). Fue, en la primera mitad del siglo XX, cuando se prohibió el empleo medicinal del cannabis debido a los efectos psicotrópicos, desencadenando la ilegalización en casi todos los países del mundo y deteniendo su uso como agente terapéutico. El uso del cannabis fue considerado como ilegal en 1925, cuando la convención de Ginebra lo incluyó dentro de la lista de drogas ilícitas y peligrosas. Actualmente, dependiendo del país, se ha legalizado su consumo, en algunos casos con fines terapéuticos, como es el caso del fármaco nabiximols (Sativex®).

Debido a las expectativas creadas por las posibles aplicaciones terapéuticas, la investigación de los compuestos activos de esta planta continuó y fue en 1940 cuando se aislaron los primeros fitocannabinoides, el cannabino (CBN) y el cannabidiol (CBD) (Adams y cols., 1940), este último sin actividad psicoactiva. Pero hasta 1964 no se consiguió aislar y revelar estructuralmente el principal componente psicoactivo del cannabis, el tetrahidrocannabidiol (THC) (Mechoulam y cols., 1970). Posteriormente se aislaron los cannabinoides no psicotrópicos entre los que destacan el cannabicromeno (CBC), cannabiciol (CBL) y cannabigerol (CBG) (Devane y cols., 1988).

Dos décadas más tarde, se descubrió que el efecto psicotrópico se debía a la interacción de estos cannabinoides con unos receptores específicos presentes en neuronas. En 1988 el grupo de Howlett caracterizó mediante técnicas radiométricas un receptor específico de cannabinoides en cerebro de rata, al que se denominó receptor cannabinoide tipo 1 (CB<sub>1</sub>) (Devane y cols., 1988) y poco después se clonó en el ser humano (Gerard y cols., 1991).

El THC ejerce multitud de efectos en el sistema nervioso central (SNC) y en otras localizaciones periféricas y esto es debido a su similitud con moléculas producidas de forma endógena por casi todos los animales, estas moléculas se denominan endocannabinoides. Los dos endocannabinoides principales son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). La anandamida fue descrita, por primera vez, en 1992 por el grupo del profesor Mechoulam (Devane y cols., 1992). Un año después, se identificó el segundo receptor cannabinoide, el receptor CB<sub>2</sub>, y se llevó a cabo su clonaje a partir de bazo de rata (Munro y cols., 1993). El 2-AG fue descrito en 1995 (Mechoulam y cols., 1995), el cual presentaba afinidad tanto para el receptor CB<sub>1</sub> como para el receptor CB<sub>2</sub>.

## 5.2 Sistema cannabinoide

Los receptores cannabinoides (CB), junto con los cannabinoides, independientemente de su origen, y los sistemas específicos de síntesis y degradación de los mismos constituyen el denominado sistema cannabinoide. En la actualidad el estudio de las funciones que desempeña despierta gran interés por las posibles aplicaciones terapéuticas.

## 5.3 Ligandos de los receptores cannabinoides

### Agonistas

Los agonistas de receptores cannabinoides se clasifican en tres grupos dependiendo de su origen:

- **Endocannabinoides:** son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga derivados de los fosfolípidos de membrana, específicamente del ácido araquidónico que son sintetizados en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. Los más importantes son la N-araquidonil-etanolamida o anandamida (AEA) y el 2- araquidonilglicerol (2AG). Aunque tienen una estructura química semejante, ambos ligandos son sintetizados y degradados por diferentes vías enzimáticas conformando una maquinaria mucho más compleja que la de los neurotransmisores clásicos (Fezza y cols., 2014). Tienen en común que son sintetizados a demanda, en respuesta a diversos estímulos celulares y son liberados por las neuronas tras la despolarización de la membrana, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente se inactivan por un mecanismo de recaptación y degradación.

La AEA actúa como agonista parcial de los receptores CB<sub>1</sub> (Devane y cols., 1992), y como agonista de baja afinidad del receptor CB<sub>2</sub>. Los niveles más altos de AEA en SNC coinciden con las regiones en las que abunda el receptor CB<sub>1</sub>.

El 2-AG es el endocannabinoide más abundante en el SNC y parece ser un agonista cannabinoide selectivo tanto del receptor CB<sub>1</sub> como CB<sub>2</sub> (Sugiura y Waku, 2002).

Otros agonistas del sistema cannabinoide son el 2-araquidonil gliceril-éter (Noladin éter), la N-araquidonil-dopamina (NADA), o la O-araquidoniletanolamina (Virodhamina).

- **Fitocannabinoides:** son más de 80 compuestos solubles lipídicos, que se encuentran en la resina producida por las plantas *Cannabis Sativa* y son sintetizados a partir de precursores de ácidos grasos por una serie de transferasas y sintetasas (Elsohly, 2005). Son compuestos que tienen propiedades similares a los endocannabinoides, pero su estructura química es diferente; generalmente poseen una estructura carboxílica con veintiún carbonos y están formados por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno (**figura 5**).

Entre ellos destacan el Δ9-tetrahidrocannabinol (Δ9-THC o THC), Δ8-tetrahidrocannabinol (Δ8-THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN) que aparecen en cantidades diferentes según la variedad de la planta (Elsohly, 2005; Radwan y cols., 2009).

El compuesto mayoritario es el Δ9-THC, con una elevada actividad psicotrópica y tiene aproximadamente la misma afinidad por el CB<sub>1</sub> que por el CB<sub>2</sub> (Huffman, 2000).



El CBD constituye el 40% del extracto de la planta y es uno de los mejores candidatos para el uso clínico de los fitocannabinoides, ya que se trata de un compuesto que carece de efectos psicoactivos y cognitivos y posee una excelente tolerancia en humanos debido a su baja toxicidad (Mechoulam y cols., 2002). Además, se ha visto que presenta propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Hammell y cols., 2015; Ribeiro y cols., 2015), antitumorales (McAllister y cols., 2011; Murase y cols., 2014, Soroceanu y cols., 2012), antiepilépticas (Devinsky y cols., 2014), efectos antieméticos (Parker y Limebeer, 2008; Rock y cols., 2012), cardioprotector (Walsh y cols., 2010), protección contra la isquemia cerebral y la ansiedad (Mechoulam y cols., 2007) y posee propiedades antipsicóticas (Iseger y Bossong, 2015; Schubart y cols., 2014).

EL CBD no presenta afinidad por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, pero se ha descubierto que puede actuar como agonista inverso de los mismos (Thomas y cols., 2007), y además, también es antagonista del receptor GPR55 (Ryberg y cols., 2007). Por el contrario, es agonista del receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> (Mechoulam y cols., 2007; Rock y cols., 2012), del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (Mecha y cols., 2013b), de los canales iónicos TRPV1 y 2 (De Petrocellis y cols., 2008; Qin y cols., 2008) y un agonista parcial de los receptores D<sub>2</sub>High de dopamina (Seeman, 2016).

Se han realizado ensayos clínicos con estos ligandos en múltiples enfermedades. Alguno, como el nabiximols, ya se prescribe como tratamiento. Se trata de un pulverizador sublingual que contiene Δ<sup>9</sup>-THC y CBD en proporciones similares (2,7 mg/2,5 mg respectivamente). Su administración oromucosa fue aprobada en 2005 para el tratamiento de la espasticidad en EM (Perras, 2005). Actualmente su venta está aprobada en 12 países de la Unión Europea, entre los que se encuentra España.

- **Cannabinoides sintéticos:** presentan afinidad por los receptores cannabinoides, e incluyen por ejemplo el HU-210, el WIN55, 212-2 (WIN), los cuales fueron desarrollados en los años 80-90 con fines terapéuticos (Mechoulam, 2016).

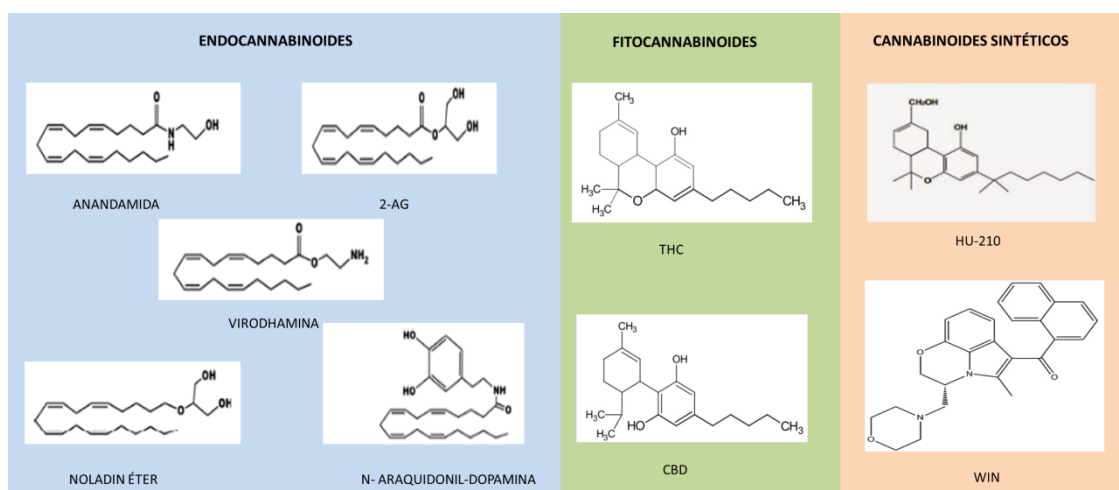


Figura 5: Estructura química de los principales cannabinoides que forman parte del sistema cannabinoide.

## Antagonistas

Son moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos de los cannabinoides mediados por receptores CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>.

SR141716A (SR1) es antagonista del receptor CB<sub>1</sub>, también conocido como Rimonabant (Rinaldi-Carmona y cols., 1994). Esta molécula fue modificada con el fin de incrementar la afinidad por el receptor, sintetizando los agonistas inversos AM251 y AM28. Otro antagonista competitivo, que difiere estructuralmente de SR1, es el LY320135.

SR144528 (SR2), es análoga a SR1 y es potente antagonista del receptor CB<sub>2</sub> (Rinaldi-Carmona y cols., 1998). Existen otros dos antagonistas selectivos de CB<sub>2</sub>: el AM630 y el O1184. Se ha descrito que ciertos ligandos, que hasta la fecha habían sido considerados antagonistas, son capaces de inhibir esta actividad constitutiva de los receptores, son los conocidos como agonistas inversos.

## Agonistas indirectos

Los compuestos inhibidores de la degradación de los endocannabinoides provocan un aumento de sus niveles, funcionando como agonistas indirectos y constituyen posibles dianas farmacológicas.

### 5.4 Receptores de cannabinoides

Existen dos receptores principales a través de los cuales los cannabinoides ejercen su función (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>). Presentan la estructura característica de receptores acoplados a proteína G (Pertwee y cols., 2012). En los últimos años se han identificado nuevos receptores con los que interactúan los cannabinoides: otros receptores acoplados a proteína G (GPR55, GPR119, GPR18), receptores vaniloides de potencial transitorio (TRPV1 y TRPV2) (Di Marzo y cols., 2015), receptores 5-HT<sub>3</sub> y canales iónicos (Mackie., 2008).

- El receptor CB<sub>1</sub> pertenece a la familia con siete dominios transmembrana, acoplados a proteínas G del tipo Gi/Go (Herkenham y cols., 1990; Howlett y cols., 2002). Está localizado fundamentalmente en la terminal presináptica de las neuronas, regulando retrógradamente la transmisión sináptica mediante la inhibición de la liberación de neurotransmisores, ejerciendo control de un exceso de transmisión excitatoria o inhibitoria y regulando de esta manera la homeostasis neuronal (Katona y Freund., 2012).

Está distribuido ampliamente por el SNC, expresándose en ganglios basales, cerebelo, corteza cerebral, así como en el hipocampo, en estructuras límbicas e hipotalámicas. También presente en tejidos periféricos como corazón, testículo, próstata, tejido vascular y sistema inmune.

- El receptor CB<sub>2</sub> juega un papel importante en la respuesta inmune y en la inflamación, expresándose abundantemente en células del sistema inmune, células hematopoyéticas (Galiege y cols., 1995; Van Sickle y cols., 2005) y en bazo (Di Marzo y cols., 2004), aunque también está presente en el sistema nervioso, especialmente en situaciones patológicas y neuroinflamatorias. Se ha localizado en la glía incluyendo a astrocitos, microglía (Maresz y cols., 2005) y progenitores de oligodendrocitos (Benito y

cols., 2008; Di Marzo y cols., 2015; Sagredo y cols., 2009), así como en determinadas subpoblaciones neuronales (García y cols., 2015; Lanciego y cols., 2011; Zhang y cols., 2017; Onaivi y cols., 2006) y progenitores neurales (Palazuelos y cols., 2006; Molina-Holgado y cols., 2007).

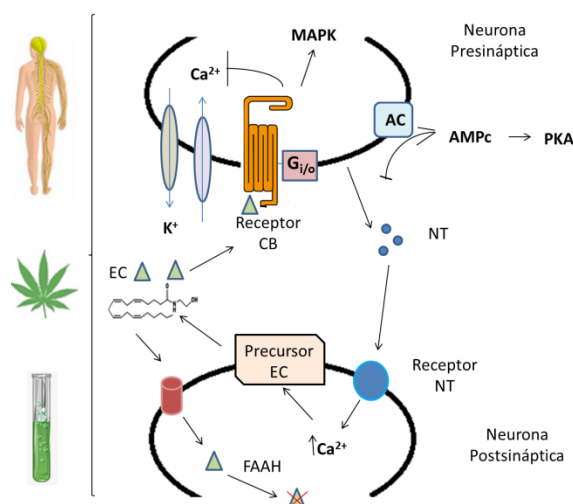
- **GPR55**, es un receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) con siete dominios transmembrana, descrito por primera vez en 1999 (Sawzdargo y cols., 1999) y no solo está altamente expresado en el SNC, sino también en el tejido periférico (Yang y cols., 2016). A diferencia de los receptores cannabinoides clásicos, GPR55 tiene una farmacología compleja pudiendo ser activado tanto por lisofosfatidilinositol (Oka y cols., 2007), como por algunos cannabinoides (Lauckner y cols., 2008).

Se ha visto que GPR55 modula la inflamación incrementando las citocinas proinflamatorias (Chiurchiù y cols., 2015) y se expresa en células inmunes, como los monocitos, las células NK (Chiurchiù y cols., 2015) y la microglía (Pietr y cols., 2009; Saliba y cols., 2018). Se han realizado estudios que sugieren que los antagonistas de GPR55 podrían ser una nueva opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la neurodegeneración y la neuroinflamación (Saliba y cols., 2018). Este receptor también se encuentra en varios tipos de cáncer de una manera relacionada con la agresividad, lo que sugiere un nuevo biomarcador de células cancerosas y un posible objetivo terapéutico. (Hu y cols., 2011; Pérez-Gómez y cols., 2013).

### 5.5 Mecanismos de acción

Como se muestra en la **figura 6**, en el momento en que los receptores de neurotransmisores (NT) se activan en la membrana de la neurona postsináptica (por ejemplo, unión de glutamato), la misma neurona comienza a sintetizar precursores de endocannabinoides, liberándolos a continuación a la hendidura sináptica. Estos cannabinoides se unirán al receptor CB de la neurona presináptica (modulación retrógrada), el cual se encuentra acoplado a proteína Gi/o. Se da entonces una inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a potencial y se favorece la salida de  $K^+$ , lo que bloquea la despolarización de la membrana y la exocitosis, y como consecuencia se bloquea de liberación de NT al exterior (Glutamato). Posteriormente los endocannabinoides serán degradados intracelularmente mediante un sistema de transporte, desconocido a día de hoy. Esta degradación es llevada a cabo mediante lipasas; amidohidrolasa o FAAH (AEA) y monoacilglicerol lipasa o MAGL (2-AG).

Otra vía de señalización que es modulada por la proteína Gi/o, acoplada a receptor CB es la vía de la adenilil ciclase (AC)-cAMP- PKA, la cual queda inhibida y con ella la inhibición de otras proteínas.



**Figura 6. Mecanismo de acción de los endocannabinoides.** Se muestran los mecanismos de síntesis, transporte y degradación descritos en el párrafo anterior.

## 5.6 Esclerosis múltiple y cannabinoides

Las investigaciones de estas últimas décadas sugieren que el sistema endocannabinoide está implicado tanto en el alivio de los síntomas de la EM, como en la regulación de las anomalías inmunes que caracterizan la enfermedad (Baker y Pryce., 2008).

Se ha demostrado la participación de los receptores CB<sub>1</sub> en la modulación de determinados aspectos de la EAE (Berrendero y cols., 2001; Cabranes y cols., 2005). Estos trabajos sugieren que los mecanismos implicados en suprimir el desarrollo de la enfermedad en el modelo, serían mediante la inducción de apoptosis de las células encefalitógenas y la conducción hacia un perfil de producción de citocinas antiinflamatorias (Sánchez y cols., 2006). En pacientes se observó la regulación del sistema cannabinoide en las células B, NK y T de sangre periférica en las formas activas de la EM y la respuesta a los tratamientos (Sánchez y cols., 2015).

Los cannabinoides pueden modular la proliferación de las células madre neurales y favorecer la supervivencia de neuronas y células de la glía. Se ha hallado expresión del receptor CB<sub>1</sub> (Aguado y cols., 2007) y CB<sub>2</sub> (Palazuelos y cols., 2006) en progenitores neurales probándose su participación en la proliferación y neurogénesis tras el daño citotóxico. Además, en cultivos primarios los cannabinoides podrían provocar el reclutamiento de células mesenquimales multipotenciales quiescentes en la médula ósea de ratas. CB<sub>2</sub> podría estar implicado en este efecto (Scutt y Williamson., 2007). Al contrario de lo que sucede con las células progenitoras neurales, hasta ahora no se conoce la implicación de este sistema en las células mesenquimales, salvo la publicación de Jiang sobre receptores y ligandos en células embrionarias murinas (Jiang y cols., 2007).

El CBD, que como ya se ha descrito, es el principal componente no psicoactivo de *Cannabis sativa*. Aunque a nivel farmacológico el CBD es muy diferente a los cannabinoides clásicos, comparte con ellos la capacidad de intervenir como inmunomodulador. Posee capacidad antiinflamatoria anulando la respuesta humoral

como fabricación de citocinas, factores de crecimiento, citocinas, como inhibiendo la proliferación, activación, maduración, migración y presentación de antígeno de las células del sistema inmunitario (Mechoulam y cols., 2002). Se desconoce a través de que receptores está ejerciendo su efecto, hay estudios que señalan al receptor vanilloide (TRPV1) (Burnstein., 2015) o a través del receptor GPR55, pero actualmente se desconoce su forma de acción.

Los resultados de estudios en ratones *knock out* para el receptor GPR55, a través del cual puede mediar CBD su efecto, desarrollan una EAE más leve que ratones normales (WT) (Sisay y cols., 2013), lo que hace pensar que el bloqueo del mismo podría ejercer efectos antiinflamatorios.

Por lo descrito anteriormente se plantea la posibilidad de que CBD usado a bajas concentraciones, pueda aumentar la supervivencia y características secretoras de las MSC en cultivo e incrementa el efecto terapéutico de las MSC en TA-EAE.

## 6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las MSC se han convertido en un interesante campo de estudio en el tratamiento de la EM, debido a las propiedades inmunosupresoras e inmunomoduladoras que se les ha atribuido. Además, se ha descrito que el CBD, que es uno de los principales constituyentes del cannabis sin efectos psicoactivos, posee propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Uno de los objetivos de este trabajo es determinar si las MSC y el CBD suprimen el desarrollo de la enfermedad en nuestro modelo animal. Por otra parte, dado el papel beneficioso de los cannabinoides en progenitores neurales es de interés estudiar su posible implicación en la regulación de las MSC, aspecto tampoco explorado. El CBD podría actuar por vía independiente de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en supervivencia y capacidad secretora. Asimismo, este compuesto podría contribuir a la eficacia de las MSC en TA-EAE por su efecto antiinflamatorio y sobre la propia estirpe celular, mejorando la migración de MSC a los focos inflamatorios.

Dada la importancia de los estudios preclínicos en modelos animales se quiso profundizar en el conocimiento de diferentes factores y citocinas que podrían estar implicados en la activación de las células encefalíticas *in vitro*. De esta forma se analizarían los mecanismos implicados y se podría optimizar el modelo TA-EAE, de forma que cuando las células encefalíticas se inoculen en los animales sean viables y estén activas.

En los modelos experimentales de EM que fueron inoculados con MSC se observó que estas células tienen un patrón circulatorio caracterizado por la acumulación en ganglios linfáticos y bazo, y limitada localización en el SNC. Todos los estudios con MSC llevados a cabo hasta ahora se han realizado en modelos de EAE de inmunización activa, faltando información sobre el modelo pasivo. La inflamación existente en los ganglios y en el bazo en el modelo activo podría alterar la circulación de las MSC y atrayéndolas a esos focos inflamatorios y reteniéndolas en los mismos. La utilización de un modelo de TA-EAE puede solventar este inconveniente al carecer de focos inflamatorios en la periferia. Además, al no inmunizar con CFA ni TP, se convierten en un modelo más específico para estudiar aspectos como distribución y eficacia de tratamiento. Tras la inoculación

de las MSC-GFP y debido a las características inmunosupresoras e inmunomoduladoras que se les atribuye, cabe encontrarlas en zonas de inflamación y daño tisular.

Finalmente, el estudio de este modelo de TA-EAE podría servir para mostrar cómo se modifica la circulación de las células encefalitógenas, aspecto no estudiado hasta el momento en el modelo pasivo de EAE. Así mismo, por la clínica que presentan los animales tras su inoculación, es posible suponer la localización de las mismas en el SNC.

1. Analizar la influencia de CBD sobre las MSC de ratón *in vitro*, valorando el efecto sobre la viabilidad celular, secreción de factores de crecimiento y la capacidad de diferenciación celular.
2. Estudiar el efecto del tratamiento con CBD, MSC y la combinación de ambos en el modelo de TA-EAE, cuantificando parámetros clínicos, radiológicos e histológicos.
3. Analizar los factores implicados en la activación de las células encefalitógenas empleadas para la inducción de la TA-EAE con el objetivo de optimizar este modelo.
4. Examinar los patrones circulatorios de las MSC y de las células encefalitógenas en el modelo TA-EAE mediante diferentes técnicas de marcaje: infección con lentivirus-GFP en MSC y marcaje con nanopartículas IR-820 nm Fe<sup>2+</sup> en células encefalitógenas.

## 3

## Capítulo

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el desarrollo de la presente tesis doctoral se emplearon ratones macho y hembra de la cepa C57BL/6J de 8 a 11 semanas de edad (*Charles River Breeding Laboratories*). Los animales se estabularon en instalaciones que cumplen con la directiva europea: *European Union Laboratory Animal Care Rules* (Directiva 86/609/EEC). A su llegada, los ratones fueron aleatorizados, transferidos a jaulas de plástico que contenían 5 animales/jaula y puestos en cuarentena durante una semana. Dispusieron de agua y comida *ad libitum*, y fueron mantenidos en el animalario del Hospital Universitario Puerta de Hierro en condiciones controladas de temperatura (21 a 24) °C, 40-60 % de humedad relativa y con un ciclo diario de luz/oscuridad de 12 horas.

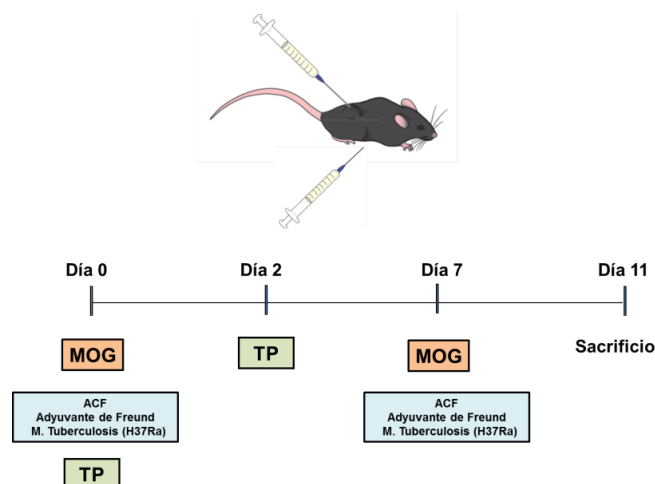
El estudio con animales se realizó de acuerdo con los protocolos aprobados por Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro y siguiendo la normativa europea (2010/63/EU) y española, Real Decreto 53/2013.

## 2. INDUCCIÓN DE EAE ACTIVA

El modelo EAE usado en los experimentos es un modelo crónico progresivo. Aunque en la literatura existen múltiples protocolos para la inducción de este modelo animal, en este estudio se utilizaron protocolos modificados en nuestro laboratorio.

Para la inducción de EAE activa los ratones machos C57BL/6 de 8 semanas fueron inmunizados por vía s.c con una emulsión que contiene 250 µg de MOG<sub>35-55</sub> (Bionova) diluido en 0.2 ml de PBS (1X) (Lonza) y el mismo volumen de coadyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma-Aldrich) suplementado con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Ra (Difco). La administración se lleva a cabo en dos puntos de los flancos de las patas, primero en un flanco el día de la inmunización y 7 días después de la inmunización (DPI) en el otro flanco. Los animales son previamente anestesiados vía inhalatoria con isoflurano. A 0 horas y 48 horas se inyectan por vía i.p 0,2 ml de PBS (1X) con 500 ng de toxina Pertussis (TP) (Sigma-Aldrich) para amplificar la respuesta inmune (**figura 7**).





**Figura 7. Esquema del desarrollo del experimento del modelo de EAE activa en ratones C57BL/6 macho.**

### Valoración de los signos clínicos:

Los ratones fueron examinados diariamente para valorar los signos clínicos de la EAE. Para ello, se estableció la siguiente escala clínica de 0 a 6 puntos:

- 0 - ausencia de signos clínicos
- 1 - pérdida parcial del tono de la cola (zona distal)
- 2 - pérdida total de fuerza en la cola
- 3 - paraparesia de una o ambas extremidades traseras
- 4 - parálisis parcial en las extremidades traseras
- 5 - paraplejia
- 6 - moribundo o muerte por EAE

## 3. CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS

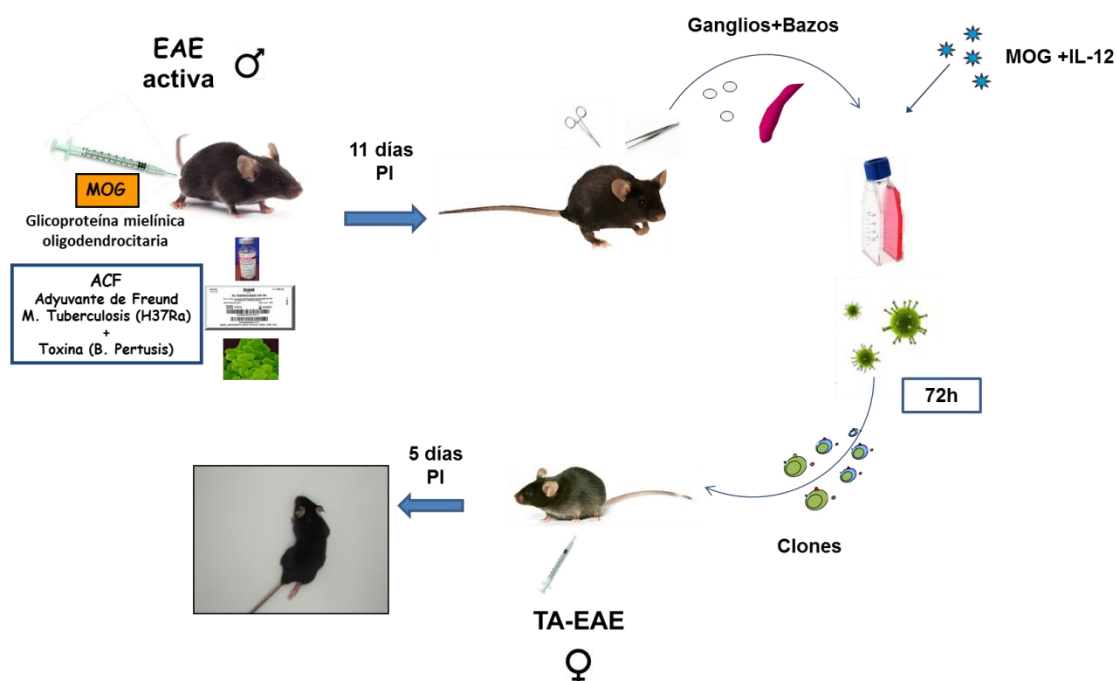
Transcurridos once días de la inoculación, los animales son sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> y seguidamente se extrajeron asépticamente los ganglios linfáticos (mesentéricos, axilares e inguinales) y el bazo con objeto de obtener células encefalitógenas. Para el aislamiento de las células se utilizaron métodos de disgregación mecánica de cada uno de los órganos por separado, usando el medio *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (Lonza) como medio de homogenización. Las células extraídas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Los eritrocitos del bazo fueron lisados añadiendo solución de tampón de lisis Amoniaco-Cloruro-Potasio (ACK) durante 5 minutos (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA).

A continuación, se procedió al cultivo mixto de células provenientes de ganglio y bazo una proporción de 1:5 (células de los ganglios linfáticos: células del bazo) a una concentración de 5x10<sup>6</sup> células/ml en medio DMEM (Lonza) suplementadas con 100 U/mL de penicilina/estreptomicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sodio, 10 mM de aminoácidos no esenciales, 4 mM de L-glutamina (Lonza) y 10% de suero fetal bovino (Biowest). Al medio se le añade MOG<sub>35-55</sub> (25 µg/ml) e IL-12 (25 ng/ml)

y se mantienen los cultivos en incubación a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 72 h para conducir la diferenciación celular hacia Th1.

#### 4. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (TA-EAE)

Las células encefalitógenas fueron cultivadas durante 72 h en condiciones normales (37 °C y 5%CO<sub>2</sub>), posteriormente se lavaron y resuspendieron en PBS, manteniéndolas en hielo. Se inyectaron 2 x 10<sup>7</sup> células en 200 µl de PBS por vía intraperitoneal (i.p) en ratones hembra C57BL/6 (**figura 8**). La evolución de la enfermedad clínica se valoró mediante la aplicación de la escala antes descrita.



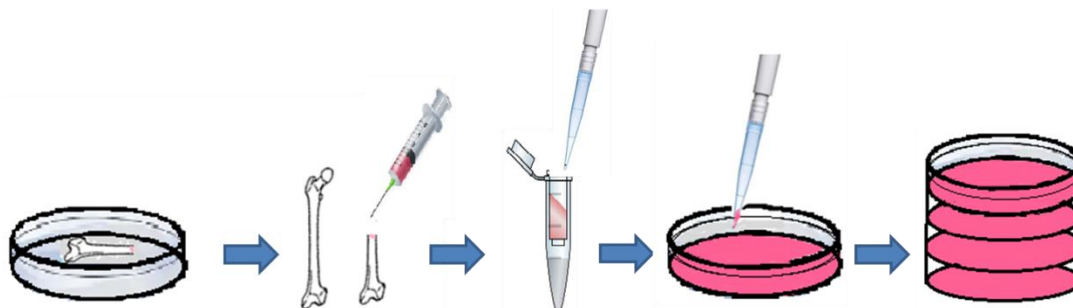
**Figura 8.** Esquema del desarrollo del experimento del modelo de TA-EAE en ratones C57BL/6 hembra.

#### 5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar Telstar Bio II A (con filtro HEPA que retiene con una eficacia del 99.9 % partículas superiores a 0.2 µm), utilizando material y soluciones estériles.

El cultivo de MSC fue optimizado en nuestro laboratorio. El procedimiento fue el siguiente: a partir de la médula ósea de tibias y fémures de ratones hembra C57BL/6 de entre 7-11 semanas de edad, se extrajeron las células, en condiciones de esterilidad, seguidamente se contaron células mononucleares totales y se plantaron a 1 x 10<sup>6</sup> células/ cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo de 25, 75 o 175 y tras una semana en cultivo en α-MEM suplementado con FBS al 20 % a 37 °C en incubador con una atmósfera de aire: CO<sub>2</sub> (5 %). El medio se cambió cada 3-4 días (Medio αMEM con Pen/Strep, Glut y 20 %

FBS). Cuando las células llegaron a un 70-80 % de confluencia se realizó su pase, sembrando a 5000 células/cm<sup>2</sup> y de nuevo se dejó hasta confluencia del 70-80 %. El cultivo se expandió aproximadamente durante dos meses (3-4 pases), para conseguir que fuese homogéneo (**figura 9**). En el pase 4 las células se congelaron en un medio con DMSO 10 % en N<sub>2</sub> líquido para su uso en diversos experimentos.



**Figura 9. Esquema de la extracción y posterior cultivo en medio  $\alpha$ -MEM de células madre de médula ósea de ratón de ratones C57BL/6 hembra.**

## 6. INMUNOFENOTIPADO DE MSC

La caracterización inmunofenotípica de las MSC para valorar su pureza e especificidad se realizó mediante citometría de flujo. Para ello, se utilizó un panel con diferentes marcadores específicos de MSC (Pittenger y cols., 1999; Kolf y cols., 2007). Se usaron como marcadores negativos CD45 (marcador panleucocitario común) y CD11b (molécula  $\alpha$ M integrina) y como positivos CD29 ( $\beta$ -1 integrina) y Sca-1 (miembro de la familia multigénica Ly-6).

Tipo de Marcaje	Antígeno de Superficie
Positivo	Stro-1 CD13 CD29 CD44 CD73 CD105 CD106
Negativo	CD11b CD31 CD34 CD45 CD117
Variables	Sca-1 CD10 CD90 Flk-1

**Tabla 1. Antígenos de superficie identificados en el aislamiento de MSC** (Kolf y cols., 2007). En sombreado se indican los marcadores usados para el inmunofenotipado de MSC obtenidas de ratones hembra C57BL/6.

Para la valoración de la pureza y especificidad de las MSC, se aplicaron protocolos de inmunofluorescencia directa multicolor con anticuerpos monoclonales: anti-CD11b FITC, anti-CD45PE, anti-Sca-1 PE-Cy7, anti-CD29APC. Los controles negativos de fluorescencia fueron establecidos con los isotipos correspondientes.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi- Biotec) ubicado en la Unidad de citometría de flujo y separación celular del Instituto de Investigación Puerta de Hierro-Segovia de Arana. Este citómetro está equipado con tres

láseres de estado sólido (láser violeta 405 nm, láser azul 488 nm y láser rojo 633 nm), que permiten la detección simultánea de hasta 10 parámetros.

Los histogramas y dot-plots de las plantillas de análisis se generaron mediante amplificación logarítmica de cada una de las fluorescencias emitidas.

El análisis de los datos se realizó mediante *software* de análisis de datos (MACSQuantify TM Software versión 2.5 (Miltenyi Biotec) y FLOWJO (TriStar).

## 7. DIFERENCIACIÓN TRILINEAR DE MSC

Diferenciación en líneas de tejido adiposo, cartílago o hueso: para este procedimiento se utilizarán los kits de R&D de diferenciación de MSC de ratón, siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. Todas las diferenciaciones se realizaron por duplicado y con un cultivo control al que no se le añadió medio de diferenciación.

### Diferenciación osteogénica:

La diferenciación osteogénica se realizó a partir de un cultivo de 4200 células en un pocillo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1ml de medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 20 % de suero fetal bovino inactivado (SBF), 1 % de penicilina estreptomicina y L- Glutamina (4 Mm concentración final), las células se mantuvieron hasta una confluencia del 50 al 70 %. En este momento se indujo la diferenciación osteogénica cambiando el medio de cultivo por un medio  $\alpha$ -MEM al que se añadió suplemento osteogénico (proteína BMP2 recombinante humana, ascorbato-fosfato y  $\beta$ -glicerolfosfato). El cultivo fue refrescado cada 3-4 días durante 2-3 semanas, momento en el que los osteocitos ya se habían diferenciado. Se procedió a fijar las células en metanol pre enfriado a -20 °C durante 10 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados en PBS de 5 minutos cada uno y se puso en NH<sub>4</sub>CL 10 mM durante 5 minutos, se retiró y se añadió Tritón 0.2 % durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió al bloqueo usando suero *Donkey* al 6 % en PBS durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió *antiosteopontin* a dilución 1/10 en suero *donkey* al 6 %, y se incubó durante toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se realizaron 3 lavados en PBS de 5 minutos cada uno y se procedió a la incubación con anticuerpo secundario *anti-goat* Alexa 488 (verde) de Invitrogen, diluido 1/500 en PBS durante 45 minutos. Se realizaron tres lavados en PBS de 5 minutos cada uno y se incubó con TO-PRO diluido 1/500 en PBS durante 30 minutos. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS para retirar el anticuerpo secundario sobrante y se observó en el microscopio confocal Leica SP5.

### Diferenciación adipogénica:

La diferenciación adipogénica se indujo a partir de un cultivo en el que se plaqueó 21.000 células/cm<sup>2</sup> en  $\alpha$ -MEM suplementado con suero, que se mantuvo hasta obtener una confluencia del 100%, momento en el que el medio de cultivo suplementado se reemplazó por medio de inducción adipogénica; que consiste en  $\alpha$ -MEM al que se añade suplemento adipogénico (hidrocortisona, isobutylmetilxantina, and indometacina en 95 % etanol). A los 3-4 días, este medio se reemplazó por medio nuevo de inducción adipogénica. A los 10-14 días se observó un cambio morfológico de las células debido a la acumulación de vacuolas lipídicas en el citoplasma observado en el microscopio.

En este momento se realizó la inmunofluorescencia con el mismo protocolo detallado para la diferenciación osteogénica. El anticuerpo utilizado para detectar los lípidos y así confirmar la diferenciación fue antiFAB4 a una dilución 1/10 en suero *donkey* al 6 %, en vez de antiosteopontin.

### **Diferenciación condrogénica:**

La diferenciación condrogénica se realizó a partir de un cultivo de 21.000 células/cm<sup>2</sup> en  $\alpha$ -MEM suplementado, que se mantuvo hasta obtener confluencia del 100 %, después de esto el medio de cultivo suplementado se reemplazó por medio de inducción condrogénica que consiste en  $\alpha$ -MEM al que se le añadió suplemento condrogénico (dexametasona, ascorbato-fosfato, prolina, piruvato y TGF- $\beta$ 3 recombinante humano). Cada 3-4 días se sustituyó el medio por uno nuevo hasta transcurridos 17-21 días, momento en el que los condrocitos ya se habían diferenciado, y se procedió a su fijación y posterior inmunofluorescencia siguiendo la metodología anteriormente descrita. El anticuerpo empleado fue anti-colágeno tipo II (Abcam) diluido 1:50 en PBS-BSA 0.1 % y el anticuerpo secundario fue anti-rabbit Alexa 488 de Invitrogen. En este caso, se debería observar la formación de matriz extracelular mediante el marcaje de colágeno.

Las diferenciaciones fueron observadas en Microscopio Confocal Leica SP5 a un aumento del 10X. Se utilizó el láser de Argon (488 nm, 500-540 nm) para visualizar Alexa 488 y la cuantificación de la fluorescencia se realizó con LASF SOFTWARE.

## **8. CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> Y GPR55 EN MSC Y CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS.**

El abordaje experimental para el estudio de la expresión a nivel de proteína de los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y GPR55 se realizó mediante dos tecnologías: Citometría de Flujo y Microscopía Confocal.

Por citometría de flujo se realizó la determinación de la expresión de estos receptores en la superficie de las células mesenquimales por marcaje indirecto usando anticuerpos policlonales anti-CB<sub>1</sub>, anti-CB<sub>2</sub> y anti-GPR55 (Abcam 1.50) durante 30 minutos en frío y posterior incubación con anticuerpo secundario IgG1 (conjugado a fluoresceína) (dilución 1:200) utilizando anticuerpos policlonales anti-CB<sub>1</sub>, anti-CB<sub>2</sub> y anti-GPR55 (Abcam) con un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo ficoeritrina.

Para el estudio por microscopía confocal se realizaron inmunofluorescencias utilizando los anticuerpos primarios anti-GPR55 (Abcam; 1:50), para receptores GPR55, anti-CB<sub>1</sub> (Abcam; 1:50), para receptores CB<sub>1</sub> y anti-CB<sub>2</sub> (Abcam; 1:50), para receptores CB<sub>2</sub>, durante 1 hora, previo bloqueo con BSA 5 %. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las muestras se lavaron y se añadió el anticuerpo secundario 2IgG1 conjugado a fluoresceína (dilución 1:200). El anticuerpo secundario empleado fue anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen).

## 9. EFECTO *IN VITRO* DE CBD SOBRE LAS MSC Y CÉLULAS T ENCEFALITÓGENAS

Para estudiar el efecto que el CBD (Tocris) puede tener sobre las MSC, éstas se trataron con diferentes concentraciones (0.1, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) de CBD a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Posteriormente, se valoró el efecto de CBD en la capacidad de diferenciación en líneas de tejido adiposo, cartílago o hueso. Para este procedimiento se utilizaron los kits de R&D de diferenciación de MSC de ratón, siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 7 de material y métodos. Las MSC se pusieron en cultivo solas, con vehículo y con CBD a 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$  para estudiar el efecto que tenía el CBD sobre ellas.

## 10. TRATAMIENTO *IN VIVO* CON MSC

Las células en pase 4 que estaban congeladas en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  se descongelaron y tras su conteo en cámara de *neubauer* con azul tripán al 0.05 %, se cultivaron a una concentración de 5000 células/ $\text{cm}^2$  en frascos de cultivo de 25, 75, 175  $\text{cm}^2$  (Nunc) o factorías de cultivo (Thermo Scientific) para su expansión celular. El recipiente seleccionado dependía del número de células de partida, que a su vez dependía del número de células necesarias para inocular a los animales TA-EAE. Se añadió medio específico de mesenquimales ( $\alpha$ -MEM con Penicilina/streptomycin, glutamina y suplementado con FBS al 20 %) para favorecer el crecimiento celular y este fue reemplazado cada 3-4 días. Cuando se obtuvieron las células necesarias para los tratamientos, fueron tripsinizadas (tripsina CC-3232) y se recogieron en tubos Falcon estériles (Corning, Cultek). Se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, posterior lavado con buffer fosfato salino (PBS) y de nuevo, se contaron para los tratamientos *in vivo*. Las células sobrantes fueron congeladas en 1 ml de medio SAFC con 10 % de DMSO (Sigma-Aldrich).

Se realizaron estudios previos, y finalmente el tratamiento con MSC consistió en 6 inoculaciones a través de la vena de la cola de los ratones, al inicio y durante el curso de la enfermedad, de  $0.5 \times 10^6$  de células en un volumen de 200  $\mu\text{l}$  de PBS. Los animales control recibieron un volumen equivalente de PBS sin células. Para cada punto evaluable de la evolución clínica de la EAE fueron utilizados un mínimo de 7 animales. La inoculación se realizó con los animales sedados con sevoflurano por inhalación.

## 11. TRATAMIENTO *IN VIVO* CON CBD

El tratamiento consistió en inyecciones de CBD (Tocris) (50 mg/kg) o del vehículo correspondiente [etanol: solutol: salino (1:1:18)] por vía i.p, 3 días consecutivos desde el día de inicio de los signos clínicos. Esta dosis se eligió sobre la base de estudios previos (Kozela y cols., 2011). El número de inoculaciones fue aumentando en base a experimentos que fueron llevados a cabo en nuestro laboratorio y que se detallan en la sección de resultados. Cada grupo estuvo formado por un mínimo de 7 animales.



## 12. RESONANCIA MAGNÉTICA DE LOS RATONES INDUCIDOS A TA-EAE

La RM se realizó en un equipo basado en un sistema de imágenes de 7-Tesla (Bruker Pharmascan) en el servicio de imagen y espectroscopia por resonancia magnética de alto campo (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM).

Los animales anestesiados mediante isoflurano se monitorizaron a los 17 días post-inmunización (DPI) de las células encefalíticas y posterior al tratamiento con CBD y MSC o la combinación de ambos. Cada grupo estuvo formado por 4 animales. Las imágenes son adquiridas en secuencias potenciadas en T1, T2 y T2\*. Durante la toma de imágenes, los animales fueron anestesiados con isoflurano y monitorizadas sus frecuencias respiratorias y cardíacas. Se obtuvieron las siguientes secuencias de resonancia magnética: T2 cuantitativo y mapa del coeficiente de difusión aparente (CDA). Utilizando la orientación de atlas cerebrales de ratones (Badeay cols., 2007; Ullmann y cols., 2013) se segmentó el cerebro en el cuerpo calloso, hipocampo, subículo, y los ganglios basales, que eran nuestras regiones de interés definidas (ROI) en cada corte. El análisis de histogramas se realizó en los ROIs con el programa ImageJ (NIH).

## 13. HISTOLOGÍA

### 13.1 Extracción y procesamiento de las muestras biológicas

Los animales fueron sacrificados mediante inhalación de dióxido de carbono y perfundidos intracardiamente con suero fisiológico. A continuación, se procedió a la extracción de cerebros y médulas espinales los cuales se mantuvieron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % y se conservaron en cámara fría a 4 °C. A las 24 h de la extracción se cambiaron a una solución PFA al 0.1%, donde se mantuvieron hasta su posterior procesamiento.

### 13.2 Inclusión en los Bloques OCT

Los tejidos, que se encontraban en PFA al 0.1 %, se pasaron por un gradiente de sacarosa para su crioprotección y de esta forma evitar la formación de cristales de hielo que dañasen la estructura tisular en el momento de la congelación.

De esta forma, las muestras tras lavado en PBS (1x) se dejaron en sacarosa al 10 % durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se pasaron al 20 % durante 3 h y por último al 30 % durante toda la noche. Estos últimos dos pasos se realizaron en agitación y a una temperatura de 4 °C.

A las 24 h se incluyeron en bloques de OCT (*Optimal Cutting Temperature Compound*) que es un medio sintético que favorece la realización de cortes en criostato a temperaturas muy bajas (-20 °C), debido a su viscosidad a temperatura ambiente. Los bloques se ultracongelaron en isopentano (-50 °C) y se conservaron a -80 °C hasta su corte en el criostato.

### 13.3 Inmunofluorescencia

Se realizaron cortes histológicos seriados de 8 micras de espesor, en criostato a -20 °C de los bloques incluidos en OCT. La visualización en el microscopio confocal nos

permitió trabajar con muestras más gruesas y así poder hacer una reconstrucción tridimensional que nos ofreció una mayor resolución en el estudio de diferentes marcadores.

Los cortes se recogieron en portaobjetos, se lavaron con PBS (1X) durante 5 minutos y se incubaron con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para evitar la autofluorescencia de la muestra. A continuación, las muestras se permeabilizaron mediante PBS (1X) con 0.5 % Tween20 (BioRad) durante 10 minutos y se incubaron durante 30 minutos con BSA al 5 %, que es una solución de bloqueo para evitar posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h:

- ANTI-MBP (Abcam; 1:100), para cuantificación de proteína básica de Mielina (MBP) para valorar desmielinización
- ANTI-SMI32 (Abcam; 1:1000), que detecta neurofilamentos no fosforilados para valorar el daño axonal
- ANTI-CD3 (Abcam; 1:20), marcador de linfocitos T
- F4/80 (Abcam; 8MB CLONE), para determinar macrófagos
- ANTI-CD45R (Anti-Rat; 1:50), marcador de linfocitos B
- ANTI-GFAP (Sigma; 1:800), para astrocitos
- ANTI-IBA-1 (Abcam; 1:200), para microglía

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS (1X) de los cortes y se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen) a una dilución 1:500 al PBS al 1 % durante 45 minutos y en oscuridad. Se realizaron de nuevo 3 lavados con PBS (1X) y se procedió a la incubación durante 30 minutos con To-Pro (Invitrogen; 1:1000), que es un marcador de núcleos intercalante del ADN. Se lavaron de nuevo con PBS (1X) y a continuación con  $\text{H}_2\text{O}$  Mili Q. Para finalizar se procedió al montaje con portaobjetos con aceite de montaje (Thermo) y pasadas un mínimo de 24 h se procedió al análisis.

En la Unidad de microscopia confocal Instituto de Investigación Puerta de Hierro-Segovia de Arana se adquirieron las imágenes en diferentes secciones o planos ópticos de las muestras a estudio utilizando un microscopio confocal LEICA TCS SP5 (Wetzlar, Germany), y mediante el software específico de Leica se llevaron a cabo los análisis tridimensionales y cuantificación de la señal de fluorescencia de las diferentes muestras.

### 13.4 Tinción de Hematoxilina y Eosina

Esta tinción se hizo para comprobar que los tejidos siguen manteniendo su estructura tisular y que no se encontraban dañados. Especialmente se realizó para la zona lumbar de las médulas espinales de los animales estudiados. Una vez terminada la tinción de los cristales, se montaron los portaobjetos con medio de montaje y se procedió al estudio del tejido.

## 14. OPTIMIZACIÓN DEL MODELO TA-EAE

Para la optimización del modelo de TA-EAE se probaron diferentes condiciones: se activaron las células a diferentes tiempos de estimulación (60 h, 72 h y 96 h), se aumentó de la concentración de  $\text{MOG}_{35-55}$  a 50  $\mu\text{g/ml}$  y se probó la activación con IL-12 e IL-12 +



IL-18 (25 ng/ml). Para comprobar que las células se han diferenciado a Th1 en el momento que se inocularon a los ratones hembra C57BL/6 se comprobó la presencia en el cultivo de IL-2 e IFN- $\gamma$  (principales citocinas secretadas por células T CD4+ maduras para mediar su acción sobre otras células durante la respuesta inmune). Por otro lado, se estudió el marcador de activación CD69. CD69 es una lectina tipo C que participa en la migración de linfocitos y la secreción de citocinas. La expresión de CD69 representa uno de los primeros indicadores disponibles de activación de leucocitos y su rápida inducción se produce a través de activación transcripcional. La expresión de CD69 en la membrana de las células inflamatorias ha sido descrita en numerosas enfermedades inflamatorias. Se utilizó citometría de flujo para poder cuantificar estos marcadores de activación mediante anti-CD69 FITC, anti-IFN gamma PE y anti-IL-2 APC.

Se seleccionaron las dos condiciones que conducían a una mayor activación celular, sin afectar a la viabilidad celular (25  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> + IL-12 y 25  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> + IL-12 + IL-18). Se procedió, entonces, a comprobar si en el modelo animal las células se comportaban del mismo modo, y la condición que provocaba más activación celular iba también unida a un mayor grado de enfermedad. Los animales fueron valorados diariamente hasta día 57 post inoculación y, a continuación, médula espinal y cerebro fueron preservados en bloques para su posterior análisis histológico.

## 15. MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES MARCADAS CON GFP (MSC-GFP)

### 15.1 Infección de MSC con lentivirus- GFP

Se descongelaron las MSC en pase 4 y se sembraron a razón de 7000 células / cm<sup>2</sup> en placa P12 (4cm<sup>2</sup> / pocillo). Se añadió medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 20 % de suero fetal bovino inactivado (SBF), 1 % de penicilina estreptomicina y L- Glutamina (4 Mm concentración final). Se dejaron adherir toda la noche y al día siguiente se comprobó la confluencia de 70-90%. Se retiró medio de cultivo hasta dejar 700  $\mu$ l/pocillo de los 2 ml iniciales y se añadió 5  $\mu$ l de lentivirus-GFP por pocillo. La transducción celular se llevó a cabo con un vial de 5  $\mu$ l, (10<sup>5</sup> Unidades infectivas por mililitro).

Transcurridos dos días en incubador a condiciones normales (37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>) se comprobó la eficiencia de infección de las células mesenquimales mediante revisión cualitativa con un microscopio invertido con unidad de epifluorescencia (Nikon) y de forma cuantitativa por citometría de flujo recogiendo la emisión de fluorescencia de la GFP en el detector B1-A del citómetro (dotado con filtro para longitud de onda de emisión de 530 nm equivalente a la emisión de la proteína fluorescente GFP).

El cultivo se mantuvo hasta obtener una confluencia del 80-90 % en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 20 % de SBF, 1 % de penicilina/estreptomicina y 2,2 % L- Glutamina. En esta confluencia se realizó el pase de las células por medio de tripsinización (tripsina de ratón CC-3232), para ello, se eliminó el medio de cultivo, se lavó con PBS 1x (Lonza), se retiró PBS y se añadió la tripsina Edta (Lonza).

Se recogieron las células de cada pocillo en tubos falcon estériles y se procedió al conteo y estudio de viabilidad mediante el uso de la cámara de Neubauer y tinción de las células con azul tripán al 0.05 %.

Se pasaron a frascos de cultivo a razón de 5000 células/cm<sup>2</sup> y se volvieron a dejar varios días hasta llegar a una confluencia del 80-90 % donde se repitió el mismo proceso. Cuando se obtuvieron aproximadamente  $3 \times 10^6$  de MSC se pasaron a factoría de una planta (5000 células / cm<sup>2</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific).

Una vez se obtuvieron el número de MSC deseadas para los posteriores experimentos se congelaron en 1ml de suero fetal bovino (SBF) inactivado con 10 % de DMSO (Sigma-Aldrich), conservándose en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C.

Para su utilización, las MSC se descongelaron en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 20 % de SBF, 1% de penicilina estreptomina y L- Glutamina (4 Mm concentración final) sumergiendo los diferentes viales directamente hasta su descongelación en baño de 37 °C.

### 15.2 Biodistribución MSC-GFP en animales control

Para detectar la presencia de MSC-GFP se emplearon técnicas de biología molecular (qPCR determinando la expresión de GFP) y de biología celular (microscopía confocal para visualización de GFP de los órganos ya extraídos).

Primero se realizó un estudio de biodistribución en controles sanos para poder establecer el patrón de circulación de las MSC-GFP, en diferentes condiciones de inoculación, tales como número de dosis y tiempo transcurrido desde la última inoculación y el sacrificio del receptor. Se realizó un seguimiento de las MSC marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) en ratones hembras C57BL/6 sanas, para lo cual se inocularon células a día 0, 2, 7 y 9 y se establecieron 3 días de sacrificio: D3, 10 y 16. La dosis de MSC-GFP fue de  $0.5 \times 10^6$  de células en un volumen de 200  $\mu$ l de PBS por día de inoculación. Se establecieron 3 grupos y cada grupo constaba de dos animales:

- Grupo 1: se inoculan MSC-GFP a D0 y D2. Se sacrificaron a D3.
- Grupo 2: se inoculan MSC-GFP a D0, D2, D7 y D9. Se sacrificaron a D10.
- Grupo 3: se inoculan MSC-GFP a D0, D2, D7 y D9. Se sacrificaron a D16.

La inoculación se realizó con los animales sedados con sevoflurano por inhalación. Las células se inyectaron vía intravenosa (i.v) en la cola del animal y estos fueron valorados diariamente para ver su estado y detectar la aparición de posibles efectos adversos derivados de la inoculación de las MSC-GFP.

Los animales fueron sacrificados en los días fijados mediante inhalación de dióxido de carbono y perfundidos intracardiamente con suero fisiológico. A continuación, se procedió a la disección de los órganos objeto de estudio (bazo, corazón, riñón, hígado, ganglios, pulmón, médula espinal y cerebro).

### 15.3 Detección de MSC-GFP mediante PCR cuantitativa

#### Purificación de ADN genómico

La técnica de qPCR se realizó en la Unidad de Secuenciación de ADN y Biología Molecular del Instituto de Investigación Puerta de Hierro-Segovia de Arana. Se hicieron cortes en los órganos seleccionados y se tomaron muestras de menos de 10 mg de peso por órgano. Se transfirieron a tubos con solución salina, que evita su desecación y, además, sirve para realizar un primer lavado del tejido. La extracción de ADN de los órganos se hizo empleando el *QIAamp® genomic DNA*, que emplea Proteinasa K para la digestión tisular (*overnight* a 56 °C con agitación en termobloque). El ADN extraído se eluyó en 50 µL de buffer ATE. La concentración de ADN genómico obtenida en cada muestra de tejido se cuantificó mediante un espectrofotómetro de pequeño volumen (NanoPhotometer Implem). Se obtuvieron concentraciones entre 50 ng/µL y 500 ng/µL.

#### PCR cuantitativa (qPCR)

A partir del ADN genómico extraído, se realizaron reacciones de amplificación del gen GFP en los diferentes órganos analizados mediante PCR cuantitativa a tiempo real en un equipo LightCycler 480 (Roche Diagnostics) con el kit "LightCycler 480 SYBR Green I Master" (Roche Diagnostics).

Para ello, se emplearon cebadores específicos de amplificación de la secuencia del gen GFP, y cebadores específicos amplificadores del gen ACTINA de ratón (*Mus musculus*). La actina fue el gen de referencia usado para el análisis. Las secuencias de los cebadores empleados son las siguientes:

Nombre Oligo	Secuencia 5' - 3'
B-Actina-Forward	CCACCATGTACCCAGGCATT
B-Actina-Reverse	CCCACCCTCACCAAGCTAAG
GFP- Forward	GAGCTGAAGGGCATCGACTT
GFP-Reverse	TTCTGCTTGTCGGCCATGAT

**Tabla 2. Cebadores empleados en el análisis de qPCR del ADN genómico de las muestras para detección de MSC-GFP.**

En cada experimento se emplearon el ADN genómico extraído de cada muestra de tejido: hígado, ganglio, riñón, bazo, corazón, pulmón, cerebro, cerebelo y médula espinal (distinguiendo entre zona cervical y lumbar), un control positivo (ADN genómico de MSC-GFP), un control negativo (ADN genómico extraído de animales no inoculados) y un control de contaminación (reacción sin ADN). Cada reacción se realizó con 100 ng de ADN.

El programa de PCR utilizado fue una incubación a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 10 segundos a 95 °C y 10 segundos a 65 °C y con un proceso de extensión final de 10 segundos a 72 °C.

EL análisis de los resultados se realizó a través del programa informático LightCycler 480 Version 1.5 Software (Roche Diagnostics), realizándose una cuantificación absoluta, cuantificación relativa y *Tm calling*.

### 15.4 Estudio histológico

Se realizó un estudio por inmunofluorescencia para complementar el análisis de detección de MSC-GFP realizado mediante la técnica qPCR. Además, esta técnica permitió determinar la localización de las MSC-GFP inoculadas dentro del tejido que se está estudiando. Se analizaron bazo y pulmón de los tres grupos de animales descritos anteriormente, ya que fueron los tejidos que resultaron positivos para la amplificación del gen GFP por qPCR.

En este caso el anticuerpo primario empleado es Anti-GFP (Invitrogen) a una dilución 1/50 en BSA al 1 % durante toda la noche. Y, posteriormente, se incubaron con TOPRO (Invitrogen; 1:1000) para visualizar núcleos celulares. Las muestras fueron analizadas usando un microscopio Leica SP5 y con el programa LASF software.

En todos los experimentos se utilizaron controles negativos que consistían en cortes de tejidos de animales en los que no se inocularon MSC-GFP. Por otro lado, se utilizaron ratones a los que se les había inoculado MSC-GFP.

### 15.5 Biodistribución MSC-GFP en animales TA-EAE

Las técnicas de detección descritas en el apartado 15.2 de animales control fueron las empleadas para el análisis de biodistribución en animales TA-EAE. La única diferencia fue el día de sacrificio de los animales (16 DPI) y que, en este caso, se inocularon MSC-GFP cinco días (0, 2, 7, 9 y 14) en vez de 4.

## 16. MONITORIZACIÓN DE LAS CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS EN ANIMALES TA-EAE

Las células encefalitógenas provenientes de bazo y ganglios de ratones macho C57BL/6 a los que se les indujo EAE fueron cultivadas durante 72 h en condiciones de activación, y posteriormente se inocularon a hembras C57BL/6, que desarrollaron una inducción pasiva de la enfermedad (TA-EAE).

### 16.1 Monitorización del Cromosoma Y

Para la monitorización de estas células encefalitógenas procedentes de machos se analizó la presencia de cromosoma Y en tejidos de animales TA-EAE.

Para ello, se realizó la extracción de los diferentes órganos de dichas hembras (corazón, pulmón, riñón, hígado, ganglios, bazo, médula espinal y cerebro) tras 16 días p.i. Estos tejidos fueron procesados y, por un lado, se extrajo ADN para su posterior análisis por qPCR y por otro, se prepararon los tejidos, como se explicó en el apartado de histología, para su estudio mediante microscopía confocal.

Se emplearon los siguientes cebadores para detectar el ADN del cromosoma Y, por qPCR:

Nombre Oligo	Secuencia 5' 3'
SRY- Forward	TTTATGGTGTGGTCCCGTGG
SRY-Reverse	CCAGCTGCTTGCTGATCTCT

**Tabla 3. Cebadores empleados en el análisis de qPCR del ADN genómico de las muestras para detección de cromosoma Y.**

Para la detección mediante microscopía confocal se usó el kit de detección (Mouse IDetect™ ChromosomeY, Empire Genomics). Los tejidos se procesaron del mismo modo que se realizó para detección de MSC.

### 16.2 Monitorización mediante Nanopartículas IR-820 nm Fe<sup>2+</sup>

Otro método utilizado fue marcar las células encefalitógenas con nanopartículas IR 820 nm cargadas con Fe<sup>2+</sup> (NP IR820 nm Fe<sup>2+</sup>), cedidas por el grupo de biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP-CSIC). Estas NP pueden ser detectadas por resonancia magnética en T2 y por microscopía confocal (reflexión) debido a su contenido en Fe<sup>2+</sup> y por microscopía confocal debido a su contenido en IR820. El Fe<sup>2+</sup> actúa como agente de contraste e IR820 es un colorante de cianina dentro de la gama del infrarrojo cercano que presenta una estructura química con un anillo central de clorobenceno y posee propiedades fluorescentes. El IR820 posee una absorción máxima de alrededor de 688 nm y una emisión máxima de 820 nm. No presenta efectos tóxicos y es eliminado a través del hígado y la vesícula biliar (Fernandez-Fernandez y cols., 2014).

### Estudios de viabilidad celular y emisión

Previa a la inoculación de los ratones con las células encefalitógenas con NP IR820 nm Fe<sup>2+</sup> para inducir TA-EAE se realizaron estudios para valorar la toxicidad de las NP y comprobar que se internalizaban en las células encefalitógenas. Para ello, se utilizaron técnicas de microscopía confocal, citometría de flujo y ensayo de *Alamar Blue* como se detalla más adelante (**figura 10**).

Se seleccionaron diferentes condiciones para ver como afectaba la concentración de las NP y la concentración del Fe<sup>2+</sup> sobre las células encefalitógenas. Las condiciones seleccionadas fueron las siguientes:

T1: células encefalitógenas sin NP

T2: células encefalitógenas con NP a concentración de Fe<sup>2+</sup> 1/100 y a dilución 1/50

T3: células encefalitógenas con NP a concentración de Fe<sup>2+</sup> 1/100 y a dilución 1/100

T4: células encefalitógenas con NP a concentración de Fe<sup>2+</sup> 1/10 y a dilución 1/50

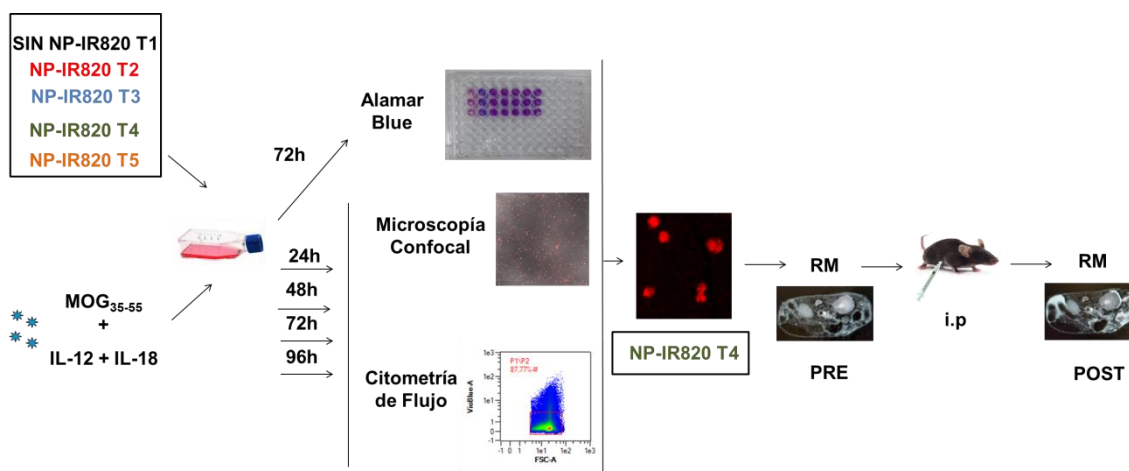
T5: células encefalitógenas con NP a concentración de Fe<sup>2+</sup> 1/10 y a dilución 1/100

Las células extraídas de animales EAE se pusieron en cultivo en medio DMEM suplementado (ya detallado en apartado 3 de material y métodos) y se estimularon con MOG<sub>35-55</sub> (25 µg/ml), IL-12 (25 ng/ml) e IL-18 (25 ng/ml). A 24, 48, 72 y 96 h se observaron al microscopio confocal Leica SP5 para comprobar la internalización de las NP. En estos mismos tiempos, se procedió a la valoración de la viabilidad celular

añadiendo DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride marcador nuclear) a las células y pasándolas por el citómetro de flujo MACSQUANT® (Miltenyi Biotec) equipado con 3 láseres de excitación y 8 canales de detección. Los softwares empleados para el análisis fueron MACSQuantify 2.5 y FlowJo (tree Star). Los histogramas de citometría de flujo fueron creados por amplificación logarítmica de la fluorescencia emitida por cada célula viable. Las células vivas fueron seleccionadas por la negatividad a DAPI. Además, este último estudio aportó información de la emisión de las nanopartículas en el canal APC-Cy7-A (R2-A).

Para completar este estudio se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular de *Alamar blue* (Invitrogen) a las 72 h de incubación de las células, momento en el cual se inocularon las células en los animales TA-EAE. La evaluación de la viabilidad celular se realizó mediante la reacción de reducción de resazurin a resorufina (adquiere color rosa fluorescente). Se compararon las cinco condiciones descritas y cada condición se ensayó por triplicado. Esta prueba nos proporcionó información sobre proliferación celular y citotoxicidad a través de la medición de absorbancia a 570 y 620 nm, obtenidos en un lector de microplacas Multiskan Ex (Thermo Scientific).

Se procedió a la inoculación de células encefalitógenas con NP en dos ratones C57BL/6 en de la condición T4 y a dos de ellos les realizó RM antes y después de la inoculación de las células marcadas. Durante la RM los animales estuvieron anestesiados y monitorizados. La RM fue realizada en el laboratorio de imagen médica (Unidad de Medicina y cirugía experimental) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. El equipo usado fue un imán 7 T Bruker Biospec y la secuencia empleada para la adquisición de imágenes fue una RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) ponderada en T2 (**Figura 10**).



**Figura 10. Estudio de internalización y viabilidad celular tras marcaje de células encefalitógenas con NP IR-820 nm Fe<sup>2+</sup>.** Se analiza el efecto de las distintas concentraciones de NP sobre las células a través de Alamar Blue, citometría de flujo y microscopia confocal. Una vez seleccionada la condición más apropiada considerando factores de viabilidad celular y emisión en IR se procedió a la inoculación de  $20 \times 10^6$  de células marcadas en dos ratones C57BL/6. Se realizó un RM previa y otra posterior a la inoculación de las células.

En paralelo se habían inoculado otros dos ratones C57BL/6 con las mismas condiciones para realizar un estudio *ex-vivo* y estudiar en paralelo los resultados obtenidos en la RM. Se visualizó



mediante microscopía confocal que existía señal tanto por el canal de infrarrojo, como por reflexión, en cerebro, médula, ganglios y bazo a 24 y 48 horas p.i.

### Estudios de biodistribución

Tras estos resultados se procedió a inocular animales con células marcadas con NP en la condición T4, y se procedió al estudio *in vitro* de los órganos (corazón, pulmón, ganglios, riñón, hígado, bazo, cerebro y médula espinal) a diferentes tiempos para intentar las células. Se establecieron 5 grupos, y cada grupo estaba formado por 5 animales.

Cada grupo estaba formado por un animal al que se le inocularon células encefalitógenas sin NP (T1), como control negativo. Otro animal al que se le inocularon solo NP, para poder estudiar el comportamiento de las mismas sin estar internalizadas en las células. Y tres animales a los que se les inocularon células con NP T4 ( $20 \times 10^6$  de células/animal). Cada grupo se sacrificó a un tiempo distinto: grupo 1 a día 1 p.i, grupo 2 a día 2 p.i, grupo 3 a día 3 p.i, grupo 4 a día 4 p.i y grupo 5 a día 7 p.i.

En los días fijados se sacrificaron los animales y se guardaron los órganos para su posterior estudio a través de microscopía confocal (metodología ya explicada en el apartado 13 de histología). En este caso, la diferencia es que no es necesario usar anticuerpos, ya que las células se visualizan en IR por emisión de las NP o por reflexión gracias al  $\text{Fe}^{2+}$  que contienen. En algunos cortes si añadimos TO-PRO para teñir los núcleos y confirmar que las NP colocalizaban con ellos.

### Escala clínica

Además, para verificar que las NP no afectaban a la capacidad encefalitógena de las células se planteó un experimento para valorar la escala clínica de los animales TA-EAE. En este se establecieron dos grupos de tratamiento:

- Células encefalitógenas sin NP (n=5)
- Células encefalitógenas con NP T4 (n=5)

Durante 24 días los animales fueron valorados diariamente, momento en el cual fueron sacrificados y se procesaron los órganos para su posterior estudio histológico.

## 17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó el análisis de varianza (test ANOVA) de dos vías seguido de un test post-hoc Bonferroni/Dunn. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad de \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ . El análisis estadístico se realizó con el paquete de Stata / IC v.14.1. (StataCorp 2015. *Stata Statistical Software. Release 14. College Station, TX*).

Las puntuaciones de la enfermedad clínica en la TA-EAE para cada grupo se representaron como la media  $\pm$  SEM. Se analizaron las diferencias entre las puntuaciones de TA-EAE y de tratamiento mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  se consideraron estadísticamente significativos. Se realizó un análisis descriptivo para los ensayos ex vivo e in vitro; para las variables categóricas

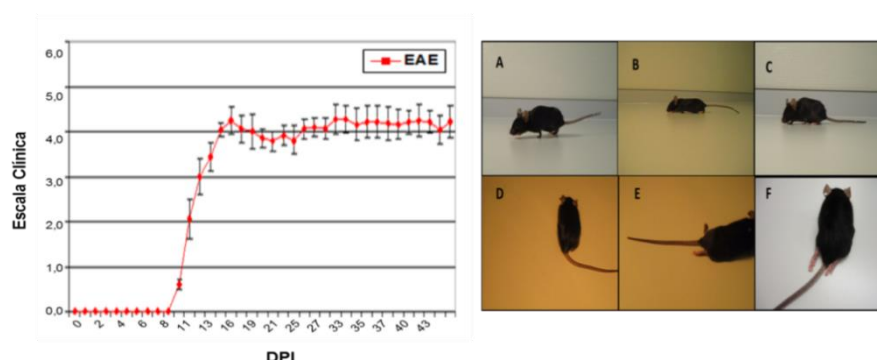
se obtuvieron las frecuencias absolutas y relativas, mientras que para las variables numéricas se utilizó la media y la desviación estándar o la mediana y los percentiles (25 y 75). Las pruebas de hipótesis se realizaron con la prueba de Kruskal Wallis en el caso de más de dos grupos y con la prueba de Mann-Whitney U para análisis post-hoc y comparaciones entre dos grupos. El nivel de significación se fijó en 0.05. Se aplicó la corrección de Bonferroni en caso de comparaciones múltiples.



## 1. MODELO ANIMAL

### 1.1 Inducción de EAE activa

En la **figura 11** se muestran los aspectos clínicos de la inducción activa de la enfermedad en ratones macho C57BL/6. Los animales comienzan a enfermar alrededor del día 11 p.i, alcanzando un grado máximo de 4 en el día 16 - 17, momento en el cual la enfermedad se cronifica.

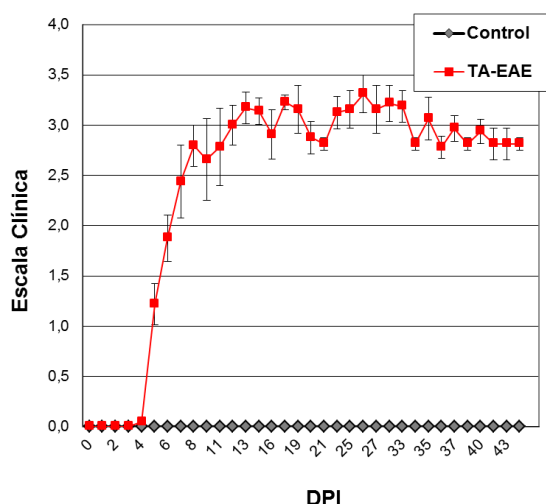


**Figura 11. Signos clínicos de la EAE representados frente a días postinoculación:** 0- sin signos clínicos; 1-pérdida parcial del tono de la cola; 2-pérdida total de fuerza en la cola; 3-paraparesia de una o ambas extremidades traseras; 4-parálisis parcial en las extremidades traseras; 5-paraplejia; 6-moribundo o muerte por EAE. Fotografías representativas de diferentes grados: 0 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) y 5 (F) de los ratones tras inoculación con MOG<sub>35-55</sub>.

### 1.2 Células encefalitógenas e inducción EAE pasiva

Para el desarrollo de los experimentos se ha trabajado con el modelo de transferencia adoptiva (TA-EAE) en la cepa C57BL/6. Una de las ventajas de este modelo, como ya hemos comentado, es que se eliminan los focos de inflamación periférica (ganglios y bazo) que existen en el modelo activo y que podrían atraer directamente la circulación de las MSC, haciendo de este un modelo más “limpio” para el estudio de la distribución celular. Otra característica a destacar es la “espontaneidad” del modelo al no utilizar CFA ni toxina pertussis en la inducción.

Como se detalla en el apartado 3 de materiales y métodos, a día 11 p.i se sacrificaron los ratones machos en los que se indujo activamente la enfermedad y estas células, tras 72 h de activación con MOG<sub>35-55</sub> e IL-12, se transfirieron a hembras C57BL/6. En la **figura 12** se observa que los animales comienzan a enfermar a día 4 a 5 p.i y el grado máximo medio alcanzado es de 3 a día 7 p.i.



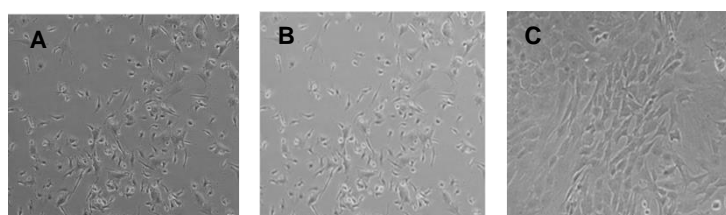
**Figura 12. Signos clínicos de TA-EAE.** Se inocularon  $20 \times 10^6$  de células encefalitógenas previamente activadas con  $25 \mu\text{g/ml}$  de MOG<sub>35-55</sub> y  $25 \text{ ng/ml}$  de IL-12 durante 72h (n=5).

## 2. CÉLULAS MESENQUIMALES DE RATONES C57BL/6

Una vez aisladas las MSC, extraídas de médula ósea de fémur y tibias de hembras C57BL/6 sanas, se establecieron cultivos que permitieron estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas exigidas por la ISCT (morfología, fenotipo y diferenciación trilinear), o si, por el contrario, presentaban alterada alguna de estas características.

### 2.1 Aislamiento, cultivo y expansión de las MSC

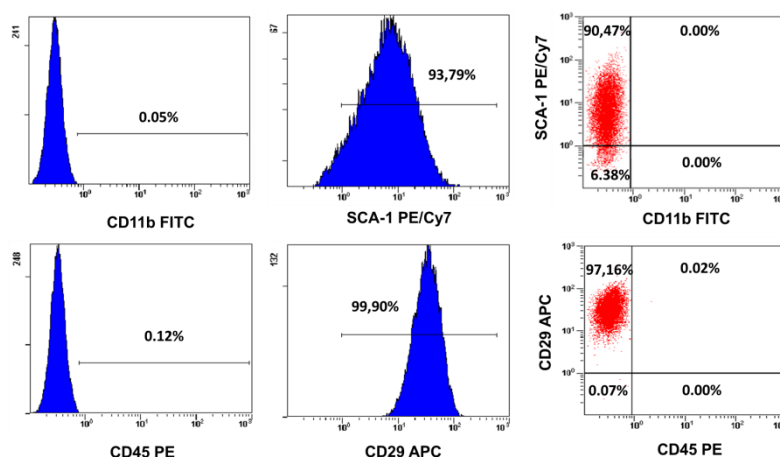
En la **figura 13** se muestra la morfología de los primeros pases de las células, y un cultivo más homogéneo en pases más altos. Se comprobó que cumplían la característica de ser adherentes y formadoras de colonias. Se observó que estas células empiezan a crecer bien en el pase 3. Durante, aproximadamente, 2 meses se mantuvo el cultivo, llegando hasta pase 4, en que se congelaron para su posterior uso. Descongelaciones en factoría dieron un rendimiento de 15x (aproximadamente 4 duplicaciones entre 5-7 días).



**Figura 13. Cultivo de células MSC después de la extracción de células mononucleares de tibia y fémur de ratones hembra C57BL6/J.** Imágenes representativas de la morfología a P#0 (A), P#1 (B) y P#9 (C) del cultivo celular. Imágenes de microscopía en contraste de fases (10x).

### 2.2 Inmunofenotipado

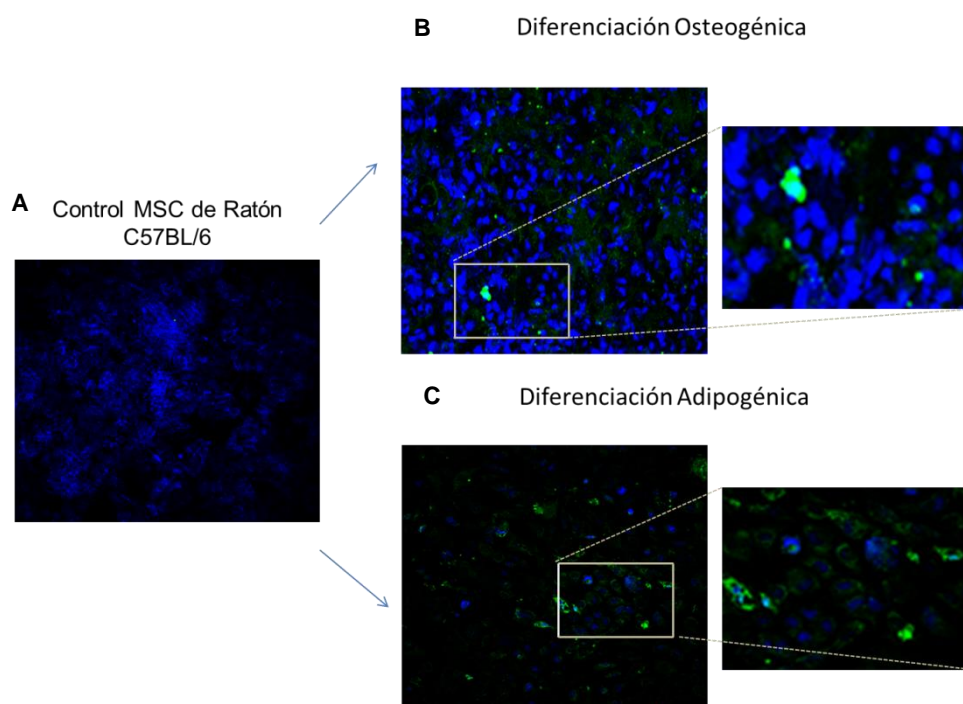
Se procedió a determinar el inmunofenotipo de las MSC de ratones C57BL/6 con marcadores positivos (antígeno-1 de las células madre Sca-1 y marcador de mesenquimales CD29) y negativos (marcador de macrófagos CD11b y marcador hematopoyético CD45) ya establecidos para MSC (**figura 14**). Por otro lado, se observó que el fenotipo de las mismas era estable durante su expansión sin variar en los pases de cultivo.



**Figura 14.**  
**Inmunofenotipo MSC**  
**de ratones C57BL/6.**  
Marcaje de cultivo en  
fase 6 con anticuerpos  
positivos, Sca-1 y CD29  
y negativos, CD11b y  
CD45 para MSC.

### 2.3 Transformación trilinear (tejido adiposo, cartílago y hueso)

Una de las características esenciales de las MSC es su capacidad de diferenciación a tejido adiposo, óseo y cartílago. No se consiguió la diferenciación a cartílago por problemas con la técnica, pero sí la hubo a adipocitos y osteocitos (**figura 15**). En el caso de la diferenciación osteogénica, las células se observan teñidas de color verde; demostrando la presencia de depósitos de calcio (hidroxiapatita inorgánica) como consecuencia de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en las células diferenciadas. En la diferenciación adipogénica las MSC diferenciadas mostraron las vacuolas lipídicas características, teñidas de color verde.



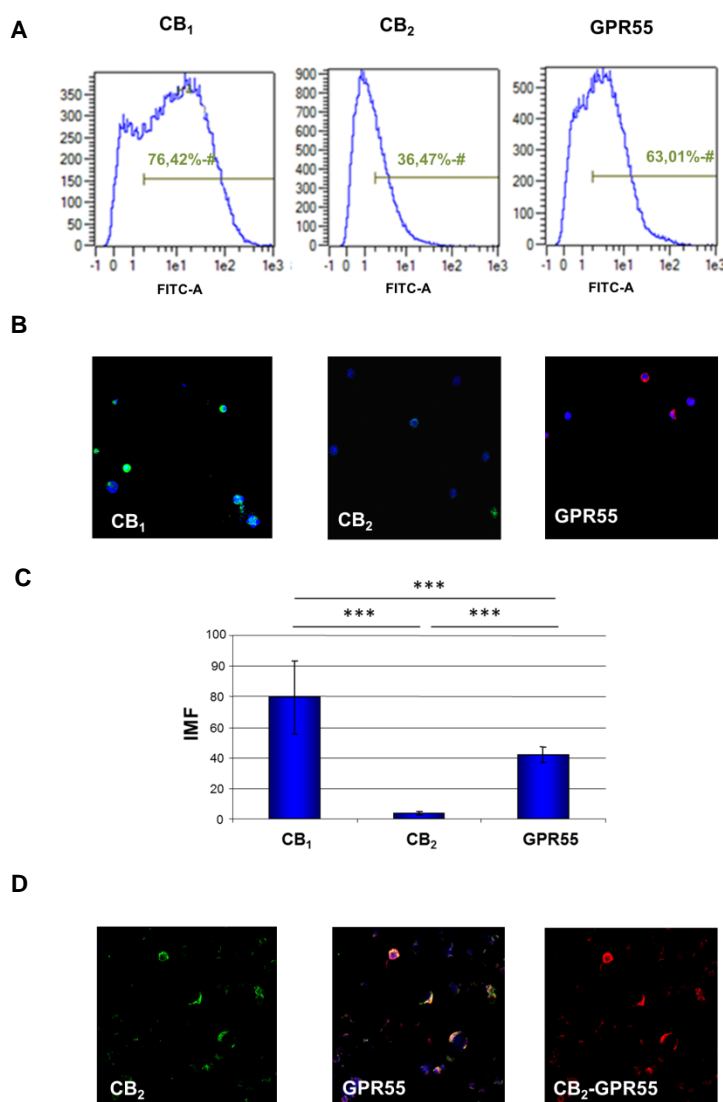
**Figura 15. Diferenciación osteogénica y adipogénica.** Imágenes de fluorescencia determinadas por microscopía confocal (10x) representando la capacidad de las MSC (A) para diferenciarse a osteocitos (B) y adipocitos (C).

### 3. TRATAMIENTOS CON CBD Y MSC

#### 3.1 Estudios *in vitro*

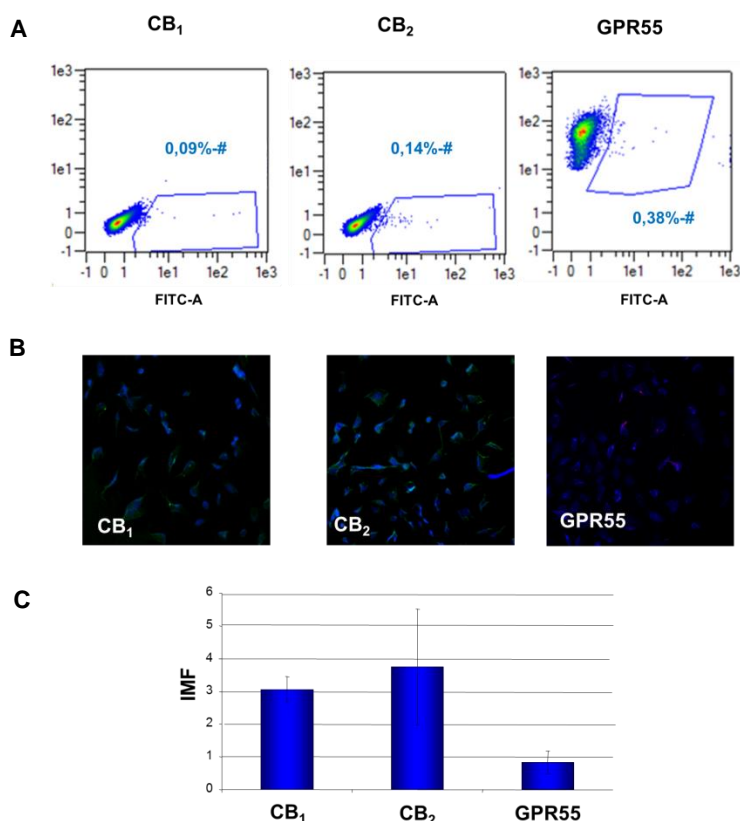
##### 3.1.1 Caracterización de los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y GPR55 en células encefalíticas y MSC

La caracterización de los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y GPR55 se realizó por microscopía confocal y citometría de flujo. Con ambas técnicas, se comprobó que en la superficie de células encefalíticas activadas con MOG<sub>35-55</sub> e IL-12 existía una mayor presencia de CB<sub>1</sub> que GPR55 y finalmente una menor presencia de CB<sub>2</sub> (**figura 16 A y B**). Además, se vió que existía coexpresión de CB<sub>2</sub> y GPR55 en este tipo celular (**figura 16 C**).



**Figura 16. Expresión de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> y GPR55 en células encefalíticas.** Las células fueron estimuladas con MOG<sub>35-55</sub> e IL-12 durante 48h y posteriormente se llevó a cabo la caracterización de los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y GPR55. (A) Análisis por citometría de flujo. (B) Determinación por microscopía confocal (10x). (C) Medias de la IMF de los receptores en células encefalíticas mediante microscopía confocal. (D) Análisis de la coexpresión de CB<sub>2</sub> y GPR55 por microscopía confocal (10x).

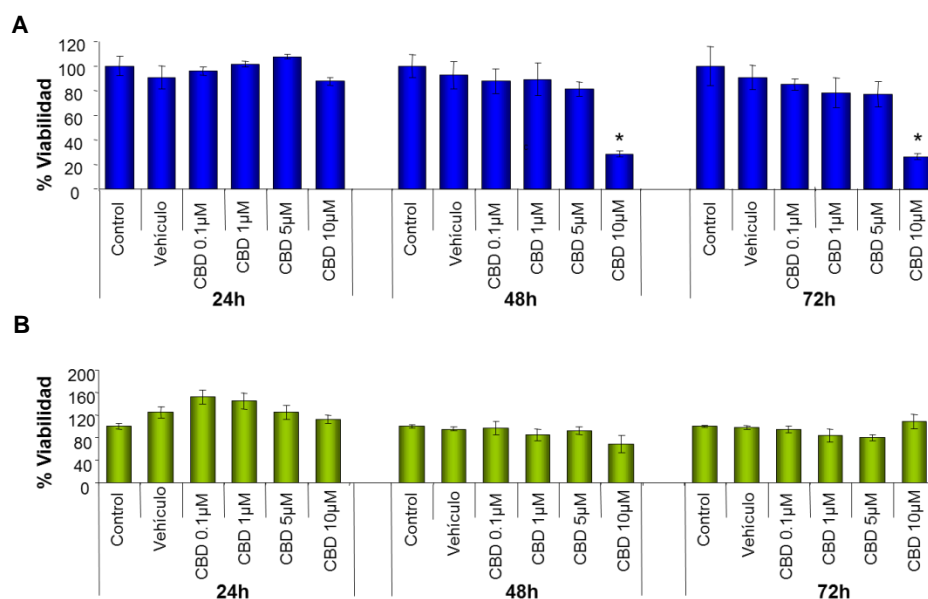
En el caso de MSC había una muy baja presencia de estos receptores sin existir diferencias de expresión entre ellos, en superficie (figura 17 A y B).



**Figura 17. Caracterización de los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y GPR55 en MSC de ratones C57BL/6.** Análisis de los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y GPR55 en superficie mediante (A) citometría de flujo y (B) microscopía confocal (10X). (C) Medias de la IMF de los receptores en MSC mediante microscopía confocal. Por ambas técnicas se certificó la escasa presencia de estos receptores en MSC.

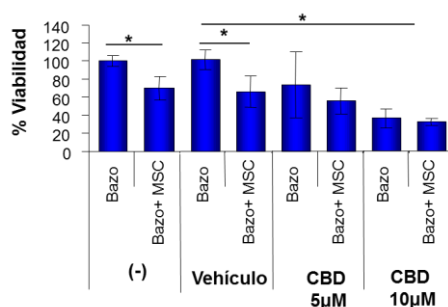
### 3.1.2 Efecto in vitro de CBD sobre células encefalíticas y MSC

En primer lugar, se hizo una evaluación de la toxicidad celular, incubando células encefalíticas y MSC a concentraciones crecientes de CBD a 24, 48 y 72 h. El análisis de viabilidad reflejó que únicamente las células encefalíticas se veían afectadas a la concentración de 10  $\mu$ M, mientras que esto no sucedía con las MSC (figura 18 A y B).



**Figura 18. Citotoxicidad del CBD en células de ratones C57BL/6.** (A, B) Viabilidad celular por MTT en  $3.0 \times 10^5$  células incubadas con CBD a las concentraciones indicadas a 24, 48 y 72 h. (A) Células encefalitógenas de bazo estimuladas con MOG<sub>35-55</sub> e IL-12 y (B) MSC de ratones C57BL/6. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos en comparación con el vehículo.

Posteriormente, se realizaron cocultivos de células encefalitógenas con MSC para comprobar el efecto antiproliferativo, ya descrito, de MSC sobre células linfoides y el efecto del CBD sobre estos cocultivos. Se incubaron con concentraciones crecientes de CBD a 48 h. Se evidenció que las células MSC producían un efecto antiproliferativo sobre cultivos de bazo y que CBD no modificaba este efecto (figura 19).



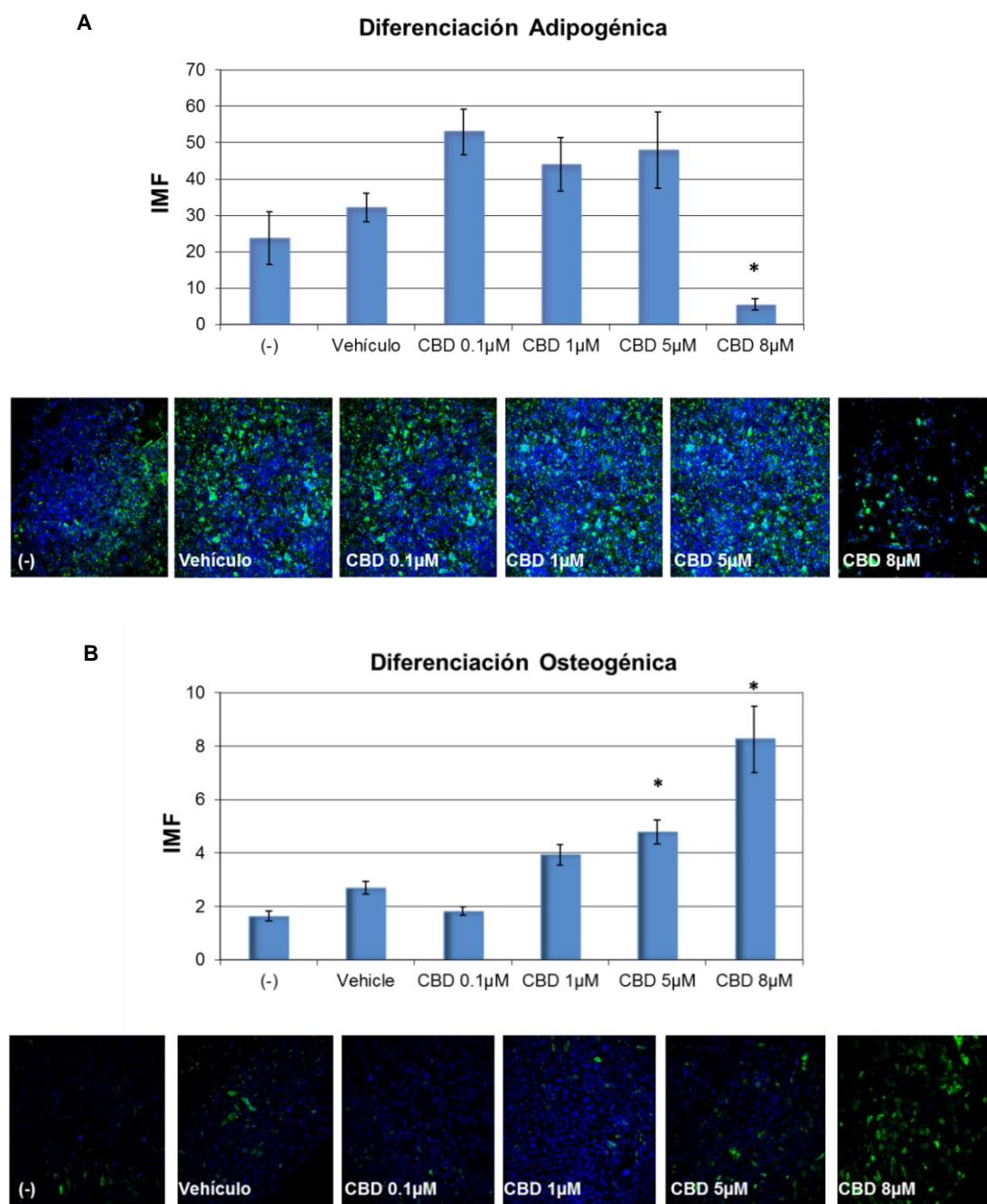
**Figura 19. Viabilidad de células de bazo encefalitógenas en cocultivo con MSC e incubación con CBD.** Viabilidad celular por MTT en  $3.0 \times 10^5$  células de bazo cocultivadas con  $1.5 \times 10^4$  de MSC e incubadas con CBD a las concentraciones indicadas a 48 h. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos, bazo vs MSC + bazo.

Por otra parte, se observó que la capacidad de las MSC de formar colonias no estaba afectada por incubación con 5 μM de CBD.



### 3.2 Transformación trilinear MSC y efecto del CBD

También se analizó el efecto del CBD sobre la capacidad de diferenciación de las MSC a adipocitos y osteocitos (**figura 20**). Aunque el CBD disminuyó la capacidad diferenciadora de las MSC hacia el linaje adipocítico a 8  $\mu\text{M}$  de forma significativa (**figura 20A**), mostró una tendencia al aumento de la diferenciación hacia osteocitos únicamente a concentraciones altas (5 y 8  $\mu\text{M}$ ) de este compuesto (**figura 20B**).



**Figura 20. Efecto del CBD sobre la diferenciación adipogénica y osteogénica de MSC de médula ósea de ratón. (A)** Cultivo de MSC incubadas con CBD a las concentraciones indicadas y diferenciadas a adipocitos durante 5 días. Determinación por tinción con anti-mouse FABP. **(B)** Cultivo de MSC incubadas con CBD a las concentraciones indicadas y diferenciadas a osteocitos durante 5 días. Determinación por tinción con anti-mouse osteopontin. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos respecto al vehículo control.

#### 4. TRATAMIENTO CON MSC Y CBD: ELECCIÓN DE DOSIS Y DÍAS DE TRATAMIENTO

Una vez inoculados los ratones con  $20 \times 10^6$  células de ratones EAE, previamente activadas con MOG<sub>35-55</sub> e IL-12 durante 72 h, se procedió a inocular  $0.5 \times 10^6$  de MSC por vía i.v a días 0 y 2, o a días 7 y 9 p.i (**figura 21A**). La gráfica muestra que no hay una reducción significativa de los signos clínicos de la enfermedad con ninguno de los protocolos de administración.

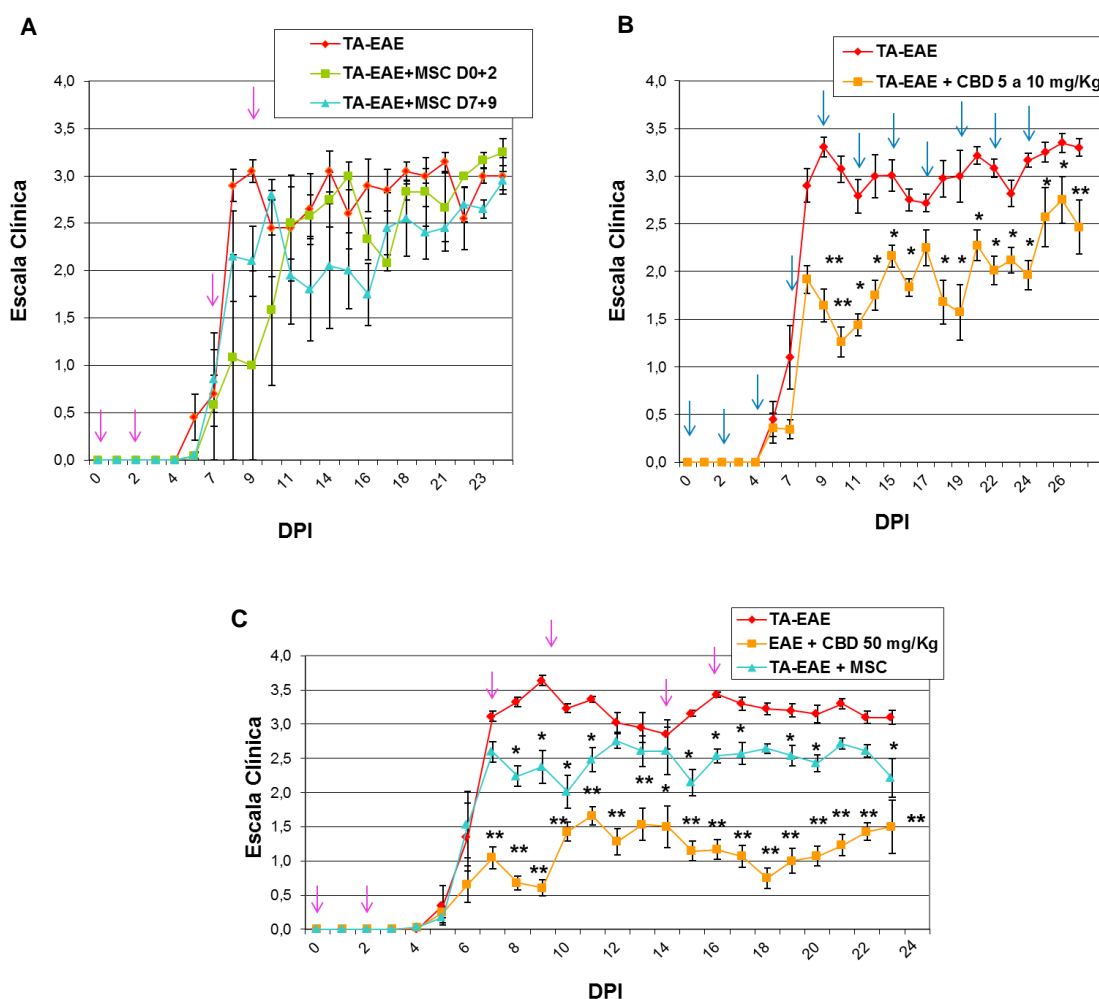
Por otro lado, para seleccionar la dosis de CBD que se iba a utilizar en TA-EAE, nos basamos en una publicación en las que se utilizaron 5 mg/kg de CBD en EAE activa (Kozela y cols., 2011). Se decidió administrar CBD por vía i.p comenzando con 5 mg/kg, incrementando 0.5 mg/kg a días alternos hasta alcanzar una dosis de 10 mg/kg (**figura 21B**). Este protocolo de administración de CBD dio como resultado una mejoría importante de los signos de la enfermedad en comparación con los del grupo de control.

Tras estos resultados se planteó un experimento en el que se comparaba el grupo control TA-EAE, con un grupo tratado con MSC y otro con CBD, pero aumentando la dosis y/o frecuencia de administración de estos tratamientos para estudiar si afectaba en la reducción de la escala clínica. Además, este experimento permitiría comparar el efecto de ambos tratamientos en paralelo. La puntuación de la enfermedad fue monitorizada diariamente hasta el día 24 p.i.

Dado que el tratamiento con MSC no había reducido la escala clínica se decidió aumentar el número de inoculaciones a seis, los días: 0, 2, 7, 9, 14 y 16, inoculando una dosis final total de  $3 \times 10^6$  de MSC (flechas moradas). Los resultados muestran que el aumento en el número de inoculaciones produjo una mayor reducción de los signos clínicos (**figura 21C**).

Como ya se ha indicado, se procedió a incrementar la dosis de CBD a 50 mg/kg diariamente y los resultados mostraron un efecto terapéutico mayor (**figura 21C**) comparado con la dosis de 5 a 10 mg/kg. Los animales tratados con 50 mg/kg CBD no mostraron signos de letargo, catalepsia, cambios en la ingesta o cualquier otra evidencia de toxicidad en comparación con los animales que recibieron la dosis más baja. Considerando el mayor efecto clínico y la ausencia de toxicidad clínica, se utilizó una dosis de CBD de 50 mg/kg para el resto de los experimentos.





**Figura 21. Efecto terapéutico de MSC y el CBD en la TA-EAE. (A)** Inoculaciones de un millón de MSC repartidas en dos días alternos no reduce los signos clínicos de las TA-EAE. Se establecieron 3 grupos; el primero (naranja), estaba formado por animales TA-EAE sin tratamiento, el segundo (verde) por animales TA-EAE a los que se les trató a día 0 y 2 con  $0.5 \times 10^6$  de MSC cada día y el tercer grupo (azul) por animales TA-EAE tratados a día 7 y 9 con  $0.5 \times 10^6$  de MSC por día. Las flechas moradas indican el día de la inoculación de las MSC. La progresión de la enfermedad fue valorada hasta día 23 ( $n=5$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos. **(B)** El tratamiento preventivo del CBD reduce los signos clínicos de una manera dependiente de la dosis. La gráfica muestra los resultados clínicos de la puntuación del modelo TA-EAE ( $n=5$ ) y del modelo de ratones tratados con CBD ( $n=7$ ) en dosis crecientes de 5 a 10 mg/kg en los días indicados por flechas azules. **(C)** Determinación de la escala clínica en el modelo TA-EAE durante el tratamiento diario con CBD 50 mg/kg o con  $0.5 \times 10^6$  MSC inoculadas en los días indicados con flechas moradas. La progresión de la enfermedad fue valorada hasta día 23 ( $n=5$  (TA-EAE);  $n=7$  (TA-EAE + MSC);  $n=7$  (TA-EAE + CBD)).

Al comparar el tratamiento con CBD (50 mg/Kg) y el tratamiento con MSC ( $3 \times 10^6$  en seis dosis) se evidenció que ambos tratamientos reducían de manera significativa los signos clínicos, siendo más consistentes los resultados obtenidos con CBD. Tanto la media de grado máximo ( $2.75 \pm 0.16$  en el tratamiento con MSC y  $1.66 \pm 0.26$  en el tratamiento con CBD), como la media de acumulación de signos clínicos (43.51 en el

tratamiento con MSC y  $20.84 \pm 2.94$  en el tratamiento con CBD) indican una reducción significativa en ambos tratamientos. Se analizó la incidencia, mortalidad, inicio del día, puntuación máxima y puntuación acumulativa considerando la media de todos los ratones + SEM (**Tabla 4**).

Grupo Experimental	Incidencia	Mortalidad	Día Inicio enfermedad	Media de Grado Máximo	Media de acumulación de signos clínicos
TA-EAE	(5/5)	0	$5.5 \pm 0.71$	$3.64 \pm 0.11$	$55.53 \pm 1.07$
TA-EAE + CBD 50 mg/kg	(7/7)	0	$5.5 \pm 1.29$	$1.66 \pm 0.26^{**}$	$20.84 \pm 2.94^{**}$
TA-EAE + MSC	(7/7)	0	$5.5 \pm 1.29$	$2.75 \pm 0.16^*$	$43.51 \pm 2.78^*$

**Tabla 4. Representación de los valores de los parámetros indicados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).** Análisis estadístico realizado mediante ANOVA y posterior test de Tukey. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos.

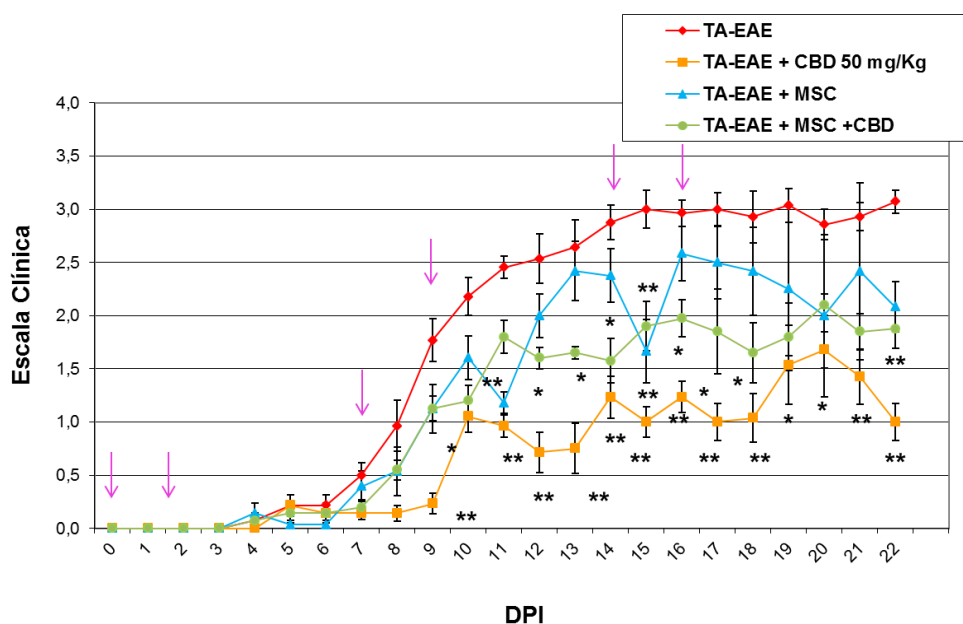
Los animales fueron valorados diariamente hasta día 23 p.i, momento en el que los animales fueron sacrificados para realizar los estudios histológicos que serán descritos más adelante.

## 5. EFECTO DE CBD Y MSC EN EL MODELO TA-EAE

### 5.1 Evaluación de la escala clínica

Uno de los objetivos de este trabajo era estudiar si existía un efecto sinérgico al emplear los dos tratamientos (CBD y MSC) de forma conjunta, comparándolos con el efecto ya descrito cuando se aplicaban de forma independiente. Para ello, se desarrolló un experimento con 4 grupos: un grupo **TA-EAE** sin tratamiento, un grupo tratado con **CBD** 50 mg/kg diariamente, un grupo tratado con  $3 \times 10^6$  de **MSC** distribuidos en 6 dosis y un grupo en el que se combinaron **CBD + MSC** con la misma pauta de tratamiento empleada en los otros grupos. Los animales fueron valorados diariamente hasta día 23 p.i, momento en el que los animales fueron sacrificados para proceder a realizar un estudio histológico más detallado. Además, se quiso completar el estudio realizando a día 17 p.i una RM a 4 animales de cada grupo para cuantificar los valores del coeficiente de difusión aparente (CDA) y ver si todos estos parámetros correlacionaban entre sí.

Los hallazgos resultantes de la valoración clínica sugieren que el CBD potenció el efecto de las MSC en el modelo TA-EAE. Si comparamos la escala clínica del grupo tratado con MSC y el grupo tratado con CBD + MSC se apreció una mayor reducción de los signos clínicos en el grupo tratado con la combinación de ambos tratamientos. Además, se observó de nuevo, que el CBD tenía un mayor potencial terapéutico que el tratamiento con MSC (**figura 22**).



**Figura 22. Signos clínicos en TA-EAE y tratamientos con CBD, MSC y la combinación de ambos.** Determinación de la escala clínica en el modelo TA-EAE durante el tratamiento diario con CBD 50 mg/kg o con  $0.5 \times 10^6$  MSC inoculadas en los días indicados con flechas moradas (D 0, 2, 7, 9, 14 y 16), además de la combinación de ambos tratamientos.

Los resultados muestran que el tratamiento con CBD y CBD + MSC reducen de manera significativa tanto la media de grado máximo ( $1.68 \pm 0.29$  y  $2.10 \pm 0.08$  respectivamente), como la media de acumulación de signos clínicos ( $15.50 \pm 2.38$  y  $24.95 \pm 1.92$  respectivamente), siendo mayor el efecto del CBD administrado solo. Por otro lado, el efecto de las MSC sobre la reducción de los signos clínicos fue menor que el producido por los otros tratamientos, pero también se observó reducción de la media de grado máximo ( $2.58 \pm 0.24$ ) y de la media de acumulación de signos clínicos ( $27.86 \pm 5.04$ ) aunque no fue significativo estadísticamente (**Tabla 5**).

En este experimento también es importante considerar la mortalidad que se dio en los dos grupos tratados con MSC (**Tabla 5**), y que en experimentos previos no había acontecido. Estos animales murieron en el momento de la inoculación de las MSC a día 7 (los 2 animales del grupo de tratamiento con CBD + MSC) y día 14 (los 3 animales del grupo de MSC).

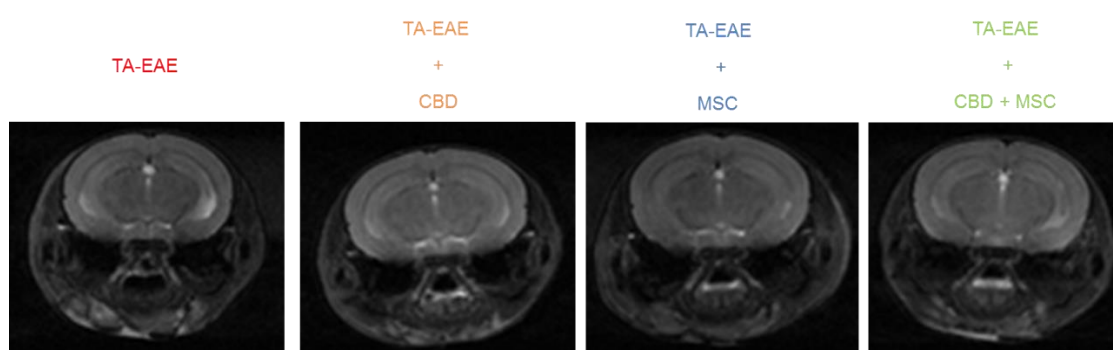
Grupo Experimental	Incidencia	Mortalidad	Día Inicio enfermedad	Media de Grado Máximo	Media de acumulación de signos clínicos	Media de acumulación de signos clínicos día14
TA-EAE	(7/7)	0	5,5 ± 0,65	3.07 ± 0.15	40.20 ± 1.98	16.42 ± 1.42
TA-EAE + CBD 50 mg/kg	(7/7)	0	7.5 ± 0.76	1.68 ± 0.29**	15.50 ± 2.38**	5.59 ± 1.06**
TA-EAE+ MSC	(4/7)	3	6.5 ± 0.76	2.58 ± 0.24	27.86 ± 5.04	12.03 ± 1.31
TA-EAE + CBD + MSC	(5/7)	2	6 ± 0.71	2.10 ± 0.08*	24.95 ± 1.92**	9.95 ± 0.93**

**Tabla 5. Representación de los valores de los parámetros indicados como la media ± error estándar de la media (SEM).** Análisis estadístico realizado mediante ANOVA y posterior test de Tukey. Valores \*p<0.05; \*\*p<0.01 se consideran estadísticamente significativos.

## 5.2 Resonancia magnética de los ratones con TA-EAE

En el SNC la difusión de las moléculas de agua depende de las células que lo forman y, esta difusión podría encontrarse alterada en el modelo animal de EAE debido a cambios en la viscosidad de los fluidos en el entorno celular, intracelulares y cambios en las membranas celulares (Schaefer y cols., 2000). Por RM se puede estudiar el coeficiente de difusión aparente (CDA) o porcentaje neto de traslación de las moléculas de agua por segundo, que aporta información sobre las características físicas de los tejidos. A través de esta técnica, se podrían observar posibles modificaciones en los valores de CDA en el modelo TA-EAE y estudiar si el uso de MSC, CBD y CBD + MSC revierten estas alteraciones en este parámetro de difusión.

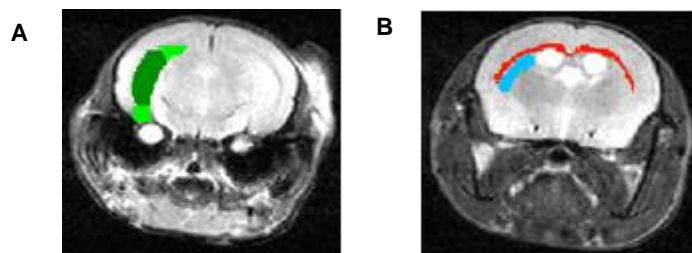
Como se muestra en la **figura 23**, no se detectaron diferencias en el volumen ventricular en la RM entre ninguno de los grupos de tratamiento comparado con el grupo TA-EAE.



**Figura 23.** Corte axial de secuencia potenciada en T2 de un cerebro de ratón representativo con **TA-EAE** no tratado, tratado con CBD (**TA-EAE + CBD**), tratado con MSC (**TA-EAE + MSC**) y con ambos tratamientos (**TA-EAE + CBD + MSC**) a día17 p.i. La RM no reveló diferencias en el tamaño ventricular entre ninguno de los grupos estudiados.

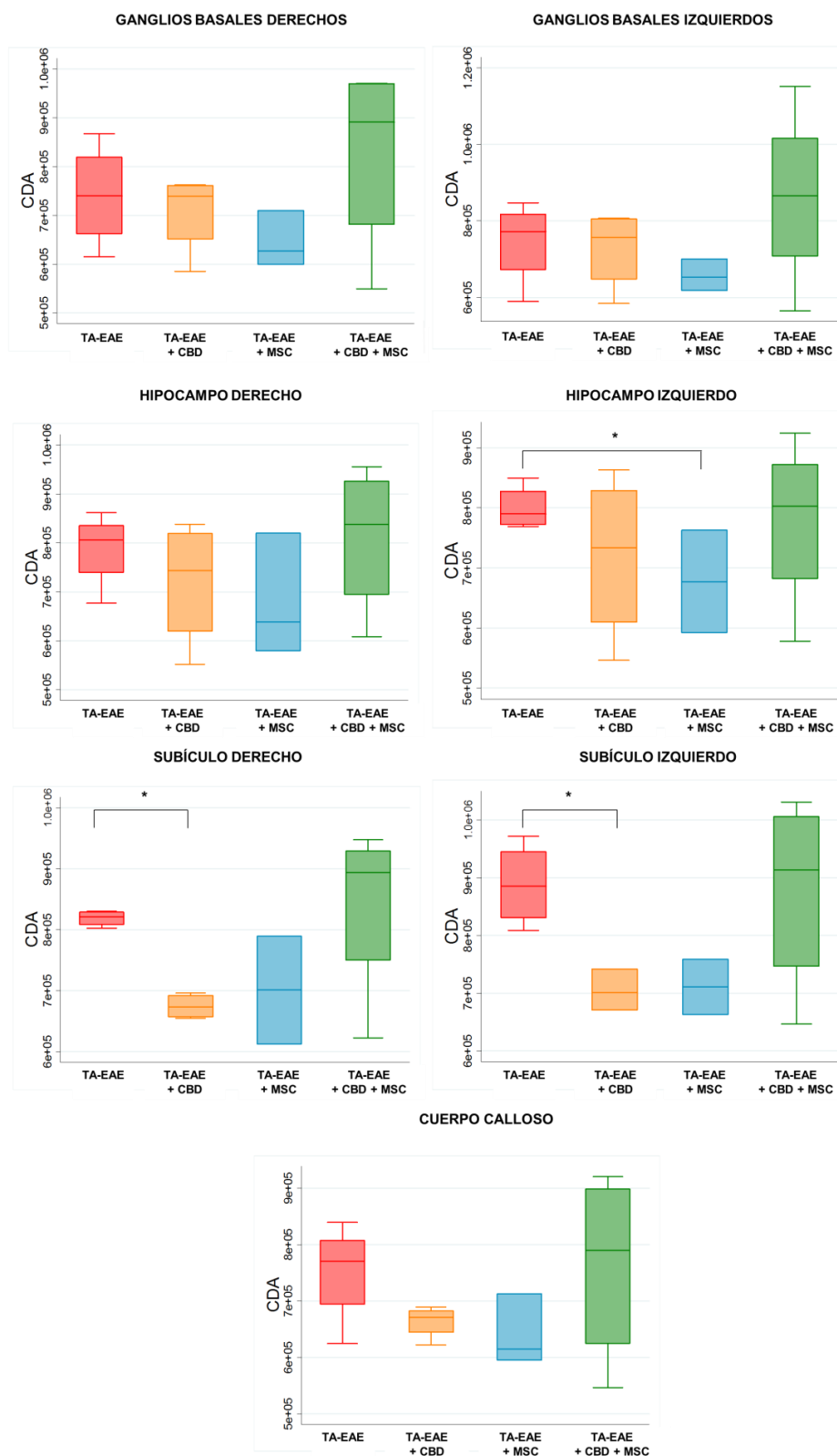
Se definió una región de interés (ROI) para su estudio que estaba formada por subículo (verde oscuro), hipocampo (verde claro), ganglios basales (azul claro) y cuerpo calloso (rojo), como se detalla en la **figura 24**. El aumento de la señal en estas áreas podría ser

consistente con la inflamación periventricular en el modelo TA-EAE. Si CBD y/o MSC ejerciesen un efecto antiinflamatorio en estas zonas seleccionadas del parénquima cerebral podría ser valorado mediante RM.



**Figura 24. Corte axial de secuencias potenciadas en T2 a nivel de (A) hipocampo y (B) ganglios basales.** En los cortes se identifican las regiones definidas de interés para el análisis de histogramas del CDA: **(A)** subículo (verde oscuro) e hipocampo (verde claro) **(B)** ganglios basales (azul claro) y cuerpo calloso (rojo).

El análisis del CDA por ROIs mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El CDA fue significativamente menor a nivel del subículo ventral en los ratones tratados con CBD comparado con el grupo EAE no tratado y se observó una tendencia a menor CDA en ganglios basales, hipocampo y cuerpo calloso en esta misma comparativa. El CDA fue significativamente menor en el hipocampo izquierdo y se observó una tendencia a menor CDA en subículo ventral, ganglios basales y cuerpo calloso en los ratones tratados con MSC comparado con los no tratados. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el CDA de los diferentes ROIs entre los ratones tratados con CBD+MSC y los ratones TA-EAE (**figura 25**).

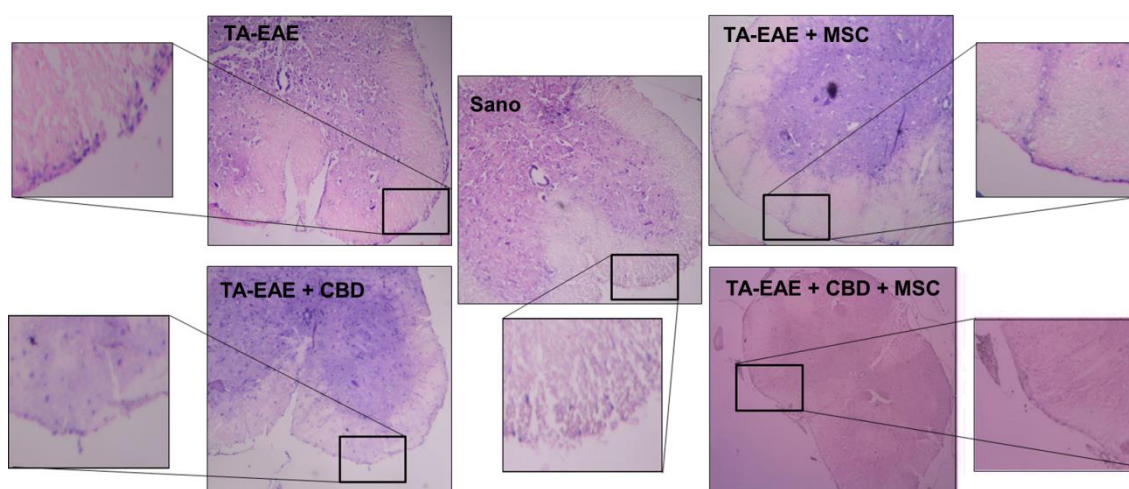


**Figura 25. Cuantificación del CDA en los ROIs (ganglios basales, hipocampo, subículo y cuerpo calloso).** Se encontraron diferencias significativas en el CDA a nivel de subículo ventral entre el grupo no tratado (rojo) y el tratado con CBD (naranja) y en el hipocampo izquierdo entre el grupo control (rojo) y el tratado con MSC (azul) (n=4). \*p<0.05 se consideró estadísticamente significativo.

### 5.3 Histología

Posterior a la valoración de signos clínicos, se procedió a la extracción y procesamiento de muestras del SNC de cada uno de los grupos. Se realizaron criocortes de 8  $\mu\text{m}$  de grosor de bloques de OCT en los que se había incluido médula espinal a nivel de zona lumbar. Los resultados mostrados provienen de dos experimentos independientes con diferente número de animales por grupo:  $n=10$  (sanos);  $n=12$  (TA-EAE);  $n=14$  (TA-EAE + CBD);  $n=11$  (TA-EAE + MSC);  $n=5$  (TA-EAE + CBD + MSC). Esta variación en el número de animales se debe a que en los grupos tratados por MSC hubo mortalidad a día 7 y 14 p.i y estos animales no se consideraron para el estudio de histología.

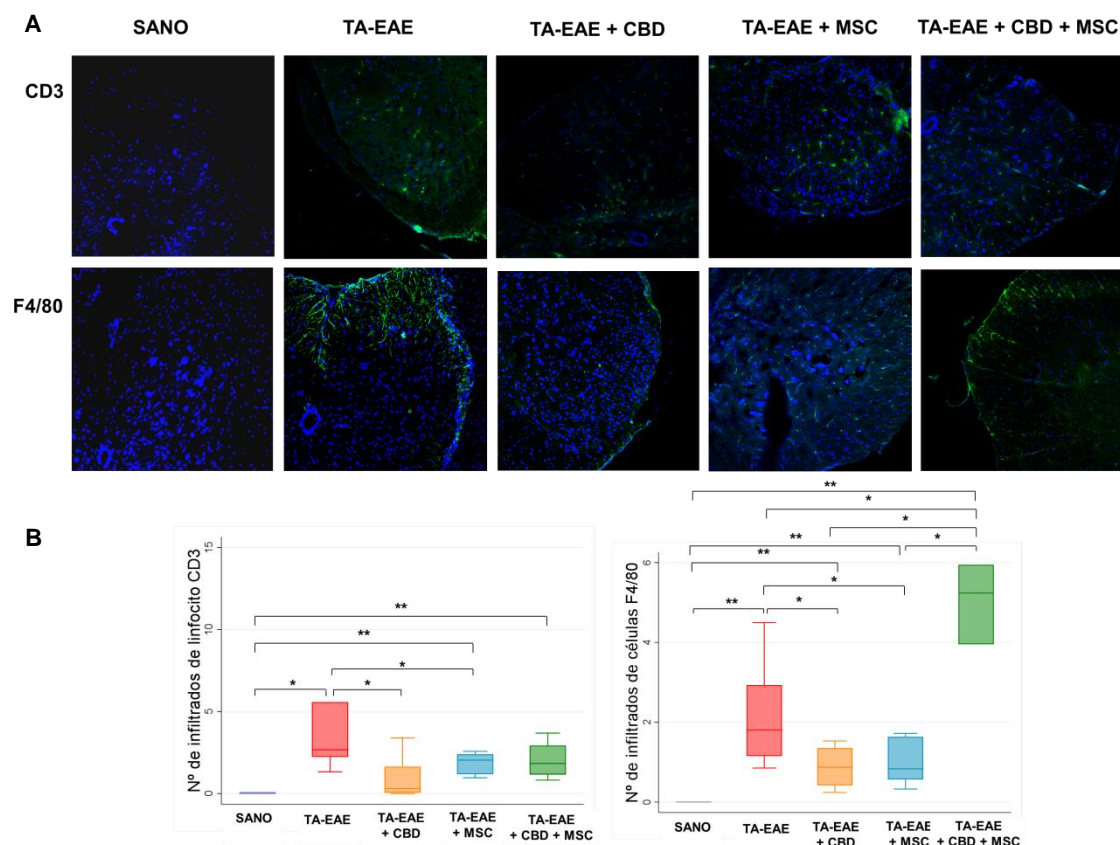
Para valorar infiltración celular se realizó tinción con Hematoxilina-Eosina apreciándose un aumento de infiltrados en ratones TA-EAE y una menor infiltración con los tratamientos, CBD, MSC y CBD + MSC (**figura 26**).



**Figura 26. Tinción con H&E de médula lumbar.** (A) Imagen representativa de tinción con H&E en secciones de 3 $\mu\text{m}$  de la zona lumbar de ratones: sano, TA-EAE, TA-EAE + CBD, TA-EAE + MSC Y TA-EAE + CBD + MSC.

Para la identificación del tipo de infiltrados en el SNC se utilizaron marcadores de linfocitos T (CD3) y macrófagos (F4/80). La disminución de células T y macrófagos fue significativa con el tratamiento con CBD y el tratamiento con MSC, mientras que con el tratamiento de CBD + MSC se observó una disminución de linfocitos CD3 no significativa y hubo un aumento significativo de la infiltración de macrófagos (**figura 27**).

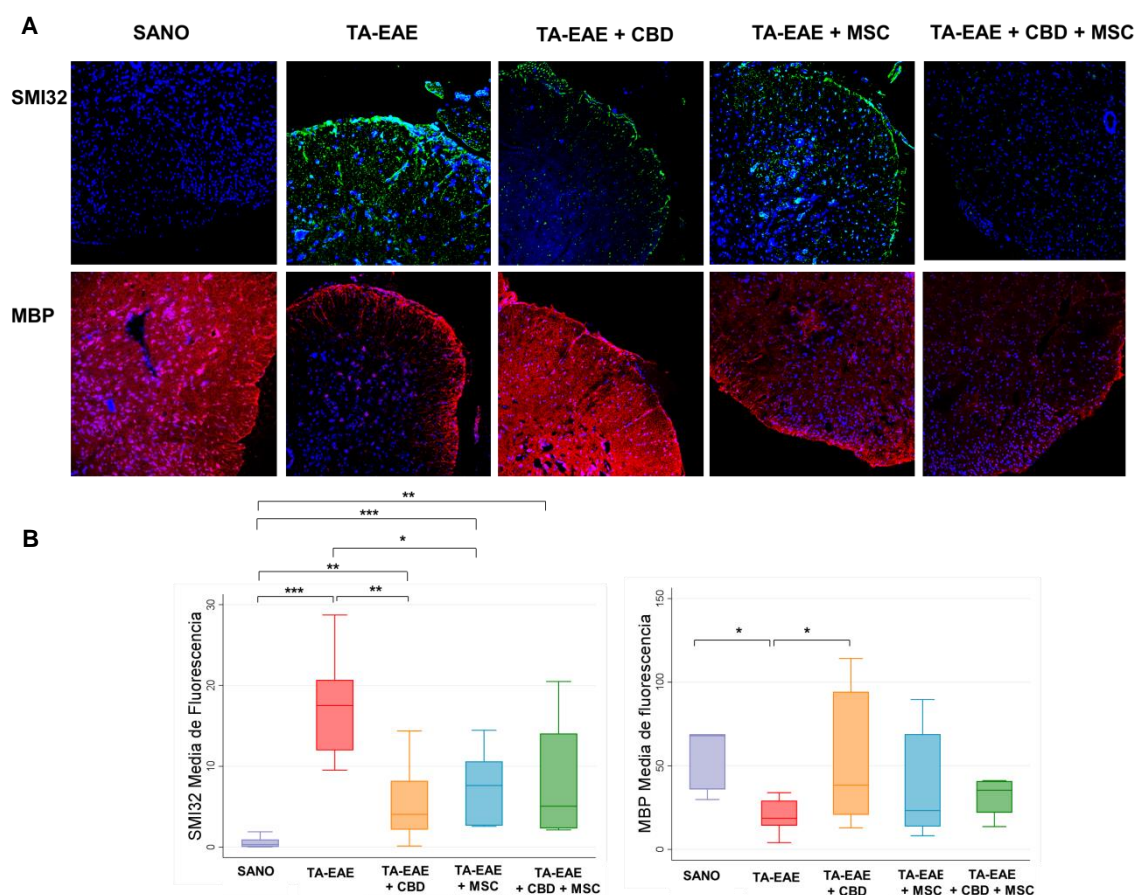




**Figura 27. Histopatología de la zona lumbar de médula espinal. (A)** Inmunotinción de la zona lumbar de médula de ratones: sano, TA-EAE, TA-EAE + CBD, TA-EAE + MSC y TA-EAE + CBD + MSC. Imágenes representativas de infiltrados de linfocitos T (CD3) y macrófagos (F4/80). **(B)** Cuantificación del número de infiltrados en cada uno de los grupos indicados. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos.

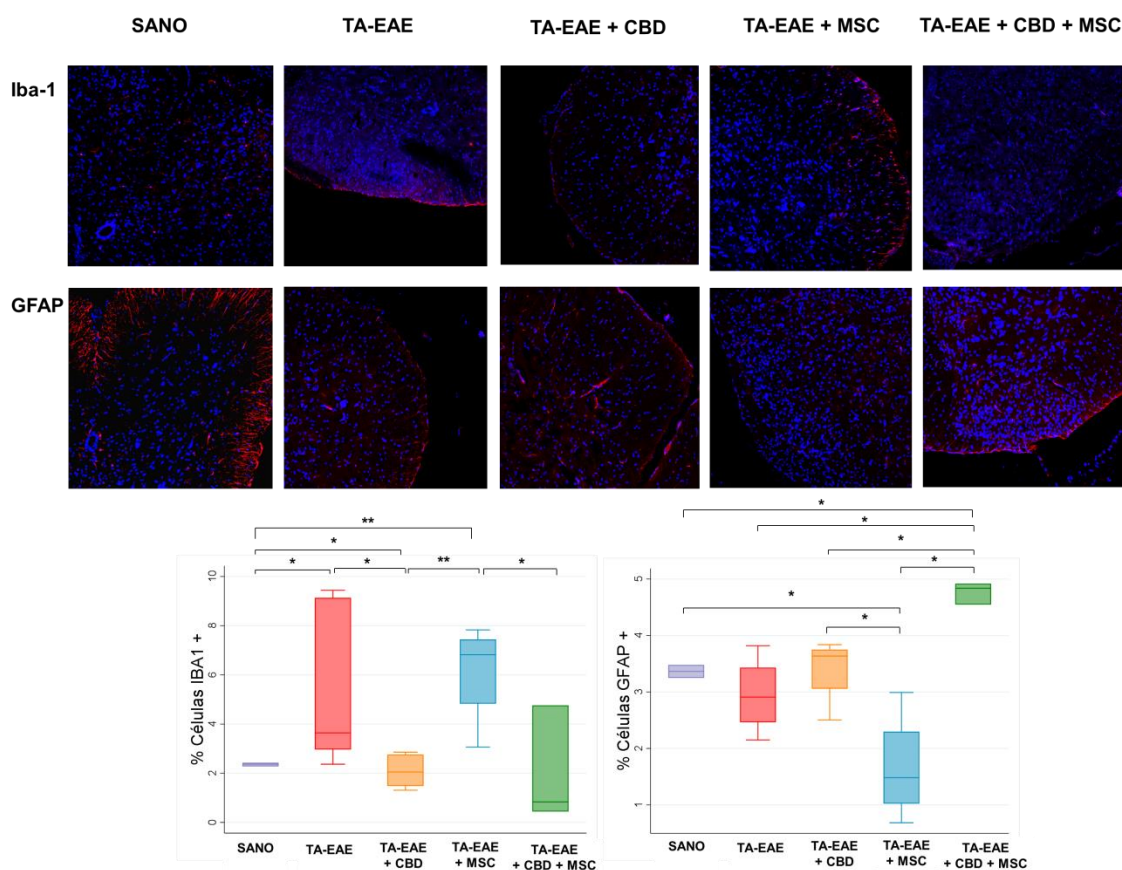
La evaluación del grado de inflamación, desmielinización y daño axonal, se hizo en cortes histológicos utilizando TO-PRO, para determinación de núcleos, proteína básica de mielina (MBP) para valorar desmielinización y SMI-32 (neurofilamentos no fosforilados) para valorar el daño axonal. Tanto la desmielinización como el daño axonal disminuyeron tras el tratamiento con CBD, sin embargo, el tratamiento con MSC solo tuvo un efecto significativo en daño axonal (**figura 28**). En el grupo tratado con CBD + MSC no se observaron diferencias significativas respecto al grupo no tratado, aunque se observa una tendencia a la disminución del daño axonal respecto al grupo TA-EAE.





**Figura 28. Histopatología de la zona lumbar de médula espinal. (A)** Inmunotinción de la médula lumbar de ratones: sano, TA-EAE, TA-EAE + CBD, TA-EAE + MSC y TA-EAE + CBD + MSC. Imágenes representativas de daño axonal (SMI-32) y desmielinización (MBP). **(B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de SMI-32 y MBP. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos.

También se determinó por inmunofluorescencia la presencia de microglía y astrocitos utilizando Iba-1 y GFAP respectivamente. En el grupo de TA-EAE se detectó un aumento de la expresión de microglía que fue menor tras tratamiento con CBD. El tratamiento con MSC no produjo disminución de Iba-1 respecto al grupo no tratado. En el caso de GFAP, aunque no hubo diferencias entre el control sano y el grupo con TA-EAE, el tratamiento con MSC disminuyó este marcador de astrocitos, y el tratamiento con la combinación de ambos tratamientos la aumentó notablemente. El CBD no produjo cambios (**figura 29**).

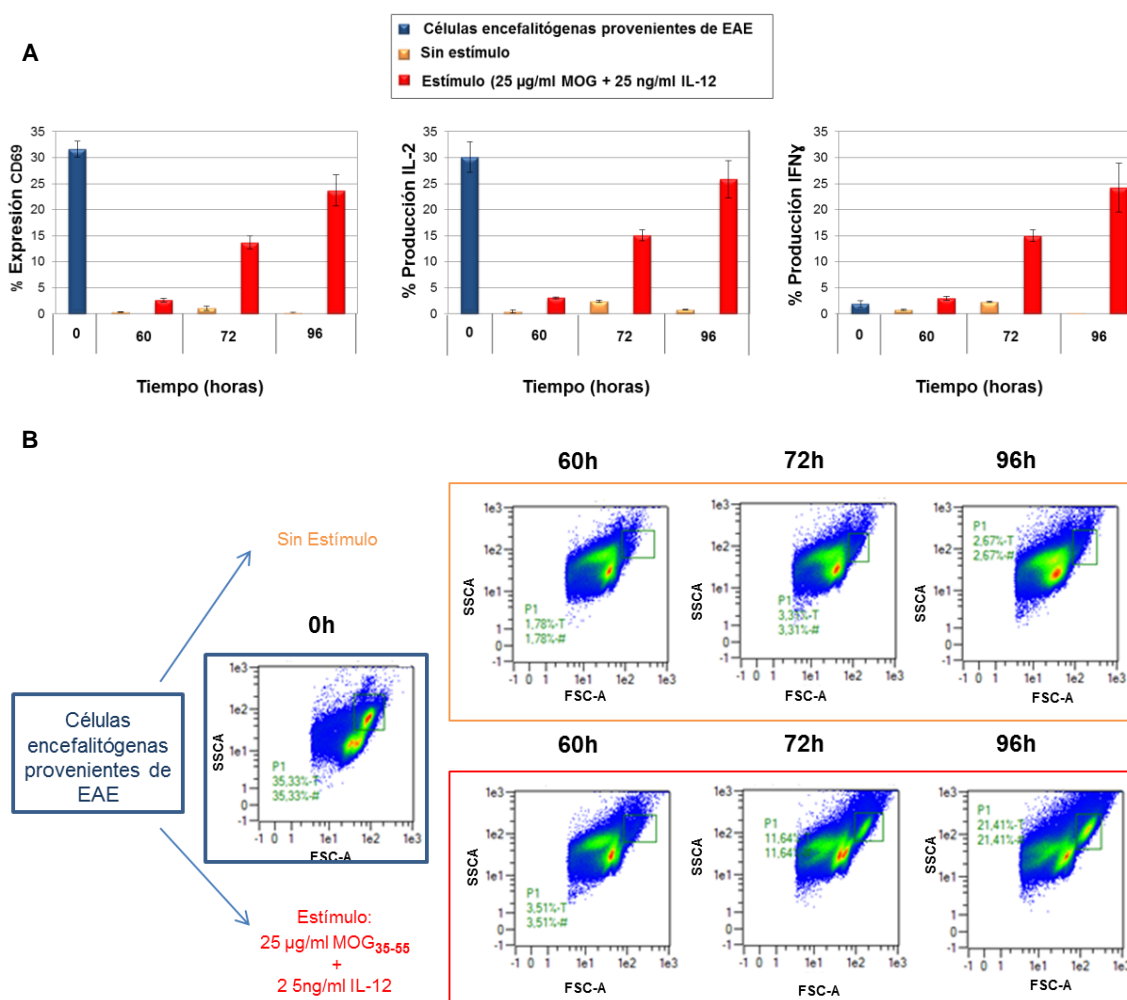


**Figura 29. Histopatología de la zona lumbar de médula espinal. (A)** Inmunotinción de ratones: sano, TA-EAE, TA-EAE + CBD y TA-EAE + MSC. Imágenes representativas de marcaje de astrocitos (GFAP) y microglía (Iba-1). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células GFAP o Iba-1 positivas. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos.

## 6. MEJORA DEL MODELO TA-EAE

En primer lugar, se realizó un estudio para ver si el tiempo de cultivo influía en la activación celular. Antes de la inoculación para la inducción de la TA-EAE, se comprobó que las células se habían diferenciado a Th1 cuantificando la cantidad de IL-2, IFN- $\gamma$  y CD69 por citometría de flujo. Para ello, se llevó a cabo una primera valoración de las células procedentes de bazo y ganglios de ratones EAE, que mostró que las células estaban activadas, pero había una escasa producción de IFN $\gamma$ .

A continuación, se pusieron en medio específico de encefalitógenas y se establecieron dos condiciones, sin estímulo y con estímulo (25 $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> + 25ng/ml IL-12). Se realizó el experimento por triplicado y se cuantificaron los marcadores establecidos a 60, 72 y 96 h de cultivo. Se observó que a medida que aumenta el tiempo de exposición, aumenta la expresión/producción de CD69, IL-2 e IFN $\gamma$  (**figura 30A**). Además, un porcentaje de células comenzó a cambiar en parámetros de tamaño FSC (forward scatter) y complejidad SSC (side scatter), siendo cuantificable a las 72 h. Esta nueva población concuerda con el perfil activado (**figura 30B**). Además, se observó que, sin la estimulación, las células no se diferenciaban a un perfil activado, como cabía esperar.



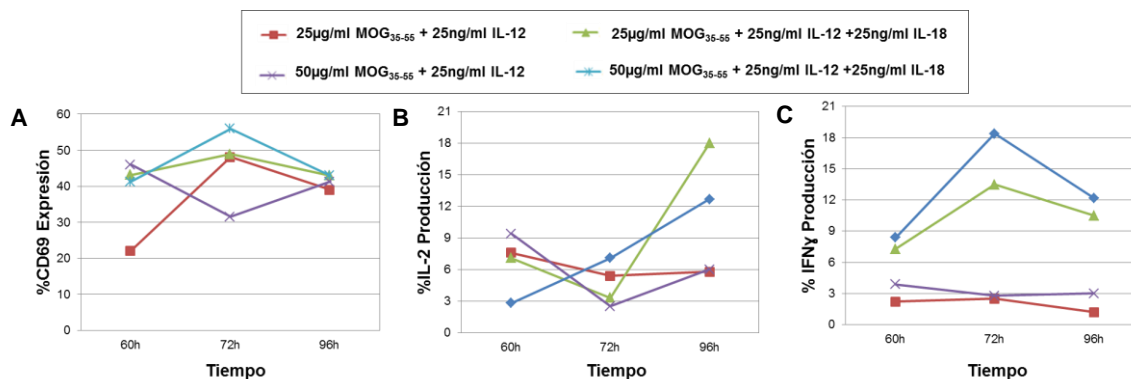
**Figura 30. El tiempo de exposición de las células a los factores de activación influye directamente en su diferenciación a Th1. (A)** El gráfico muestra la expresión de CD69, y la producción de IL-2 e IFNγ a 0h (momento en que se extraen animales EAE tras 11 días p.i), y a 60, 72 y 96 h sin y con estímulo (25µg/ml MOG<sub>35-55</sub> +25ng/ml IL-12). **(B)** El cuadro verde muestra la parcela representativa de células activadas a los diferentes tiempos ya descritos anteriormente.

A continuación, se estudiaron diferentes combinaciones de estímulos para ver el efecto de los mismos sobre la activación celular, para lo cual se establecieron 4 condiciones de cultivo y se cuantificaron marcadores de activación celular a distintos tiempos de cultivo:

- 25 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml IL-12
- 25 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml IL-12 +25 ng/ml IL-18
- 50 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml IL-12
- 50 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml IL-12+25 ng/ml IL-18

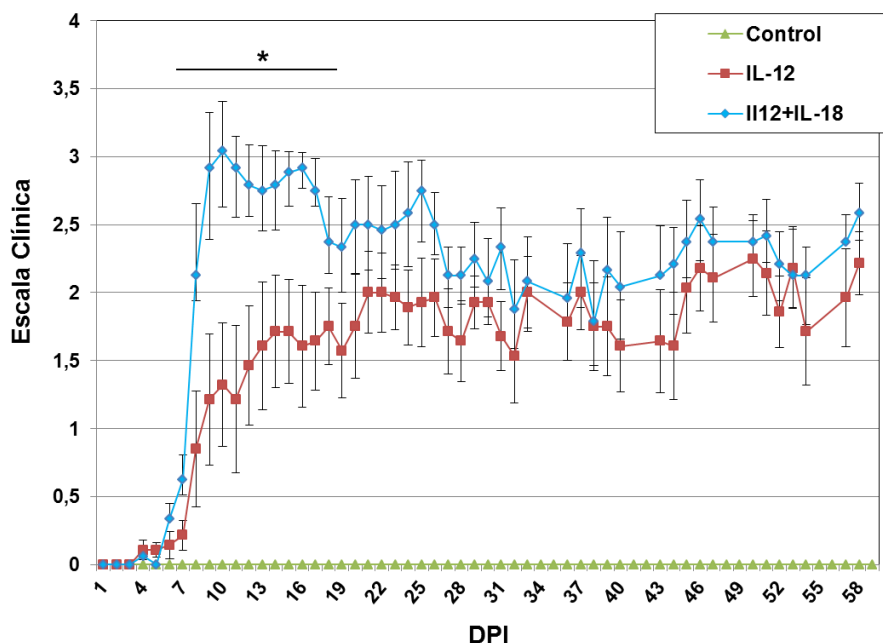
Los marcadores empleados para la cuantificación de la activación fueron los descritos en el experimento anterior y fueron estudiados mediante citometría de flujo (**figura 31**).

Se descartó la dosis de 50  $\mu\text{g/ml}$  de MOG<sub>35-55</sub> ya que produjo una reducción de la viabilidad celular. La mejor combinación fue 25  $\mu\text{g/ml}$  de MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml de IL-12 + 25 ng/ml de IL-18, ya que en ausencia de IL-18, la producción de IFN $\gamma$  se redujo, aunque los porcentajes de CD69 e IL-2 fueron similares en ambas condiciones a 72 h. Cuando se utiliza IL-18 la producción de IFN $\gamma$  aumenta significativamente a 72 h.



**Figura 31. Activación celular medida por la expresión de CD69 y el porcentaje de células productoras de IL-2 e IFN $\gamma$  a diferentes tiempos de exposición y activación diferencial. (A) Porcentaje de células CD69+. (B) Porcentaje de la producción de IL-2 (C) Porcentaje de la producción de IFN $\gamma$ .**

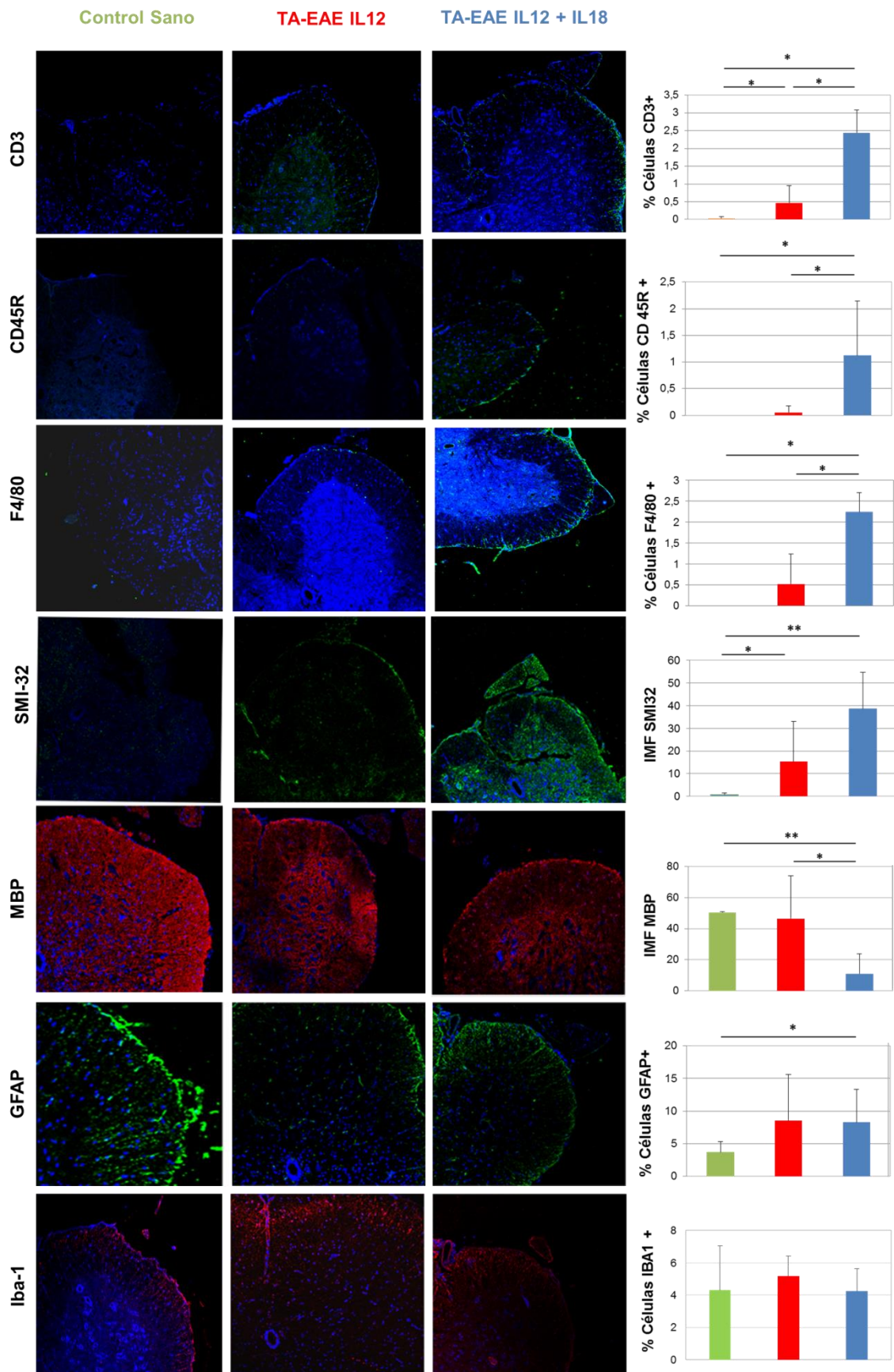
Se procedió a estudiar *in vivo* el efecto de la mayor producción de IFN $\gamma$ , para lo cual se establecieron 3 grupos de tratamiento tras 72 h de activación celular y la vía seleccionada fue la i.p. El primero estuvo formado por 5 animales sanos a los que se les inyectó 200  $\mu\text{l}$  de PBS, el segundo por 7 animales a los que se les inoculó  $20 \times 10^6$  de células encefalitógenas activadas con 25  $\mu\text{g/ml}$  MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml IL-12 y al tercero, también formado por 7 animales,  $20 \times 10^6$  de células activadas con 25  $\mu\text{g/ml}$  MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml IL-12 + 25 ng/ml IL-18. Se valoraron los signos clínicos diariamente hasta día 58, momento en el que los animales fueron sacrificados y sus órganos preservados para su posterior estudio. A partir del día 5, los animales tratados con células encefalitógenas comenzaron a enfermar y a partir de día 7 el grado de enfermedad comienza a ser estadísticamente significativo respecto al grupo control (**figura 32**). El grupo inoculado con células activadas con IL-18 se asocia a un mayor grado de enfermedad a lo largo de los 20 primeros días de evolución, lo cual podría estar relacionado con un aumento de la producción de IFN $\gamma$ .



**Figura 32. IL-12 e IL-18 regulan la activación de las células encefalíticas específicas del MOG<sub>35-55</sub>.** Las células provenientes de animales EAE fueron tratadas con IL-12, o la combinación de IL-12 e IL-18 y tras 72 h fueron transferidas i.p a ratones C57BL/6 ( $20 \times 10^6$  células/ratón). Los datos se expresan la puntuación clínica media para todos los animales hasta los 58 días postinoculación. El grupo control está formado por una n=5, y los grupos los grupos en los que se ha inoculado células tiene una n= 7 cada uno. Las células tratadas con IL-12 transfirieron una TA-EAE menos severa expresada por un pico menor y una menor incidencia que las células específicas MOG<sub>35-55</sub> tratadas con IL-12 e IL-18. Los valores de \*  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. La puntuación de la enfermedad se presentó como la media + SEM.

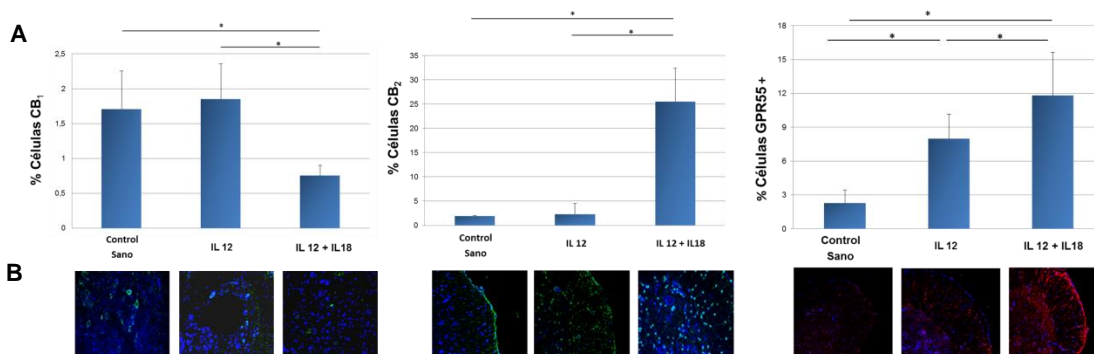
Tras el procesamiento de la médula espinal, se realizó la tinción inmunológica de las secciones del área lumbar, la cual mostró un aumento de la señal de CD3, CD45R, F4/80 y SMI-32 y menos señal de MBP en el grupo de IL-12 + IL-18 que en los ratones tratados con IL-12. Esto indica que la infiltración, el daño axonal y la desmielinización aumentan en la médula espinal de los ratones tratados con EAE IL-12 e IL-18 en comparación con los controles y los tratados con IL-12 (**figura 33**).





**Figura 33. IL-18 aumenta la infiltración, el daño axonal y la desmielinización.** Imágenes de inmunofluorescencia de las secciones de la médula espinal lumbar de ratones sanos, ratones tratados con IL-12 y ratones tratados con IL-12 + IL-18 en el día 58 después de la inoculación. To-Pro (azul): núcleos; CD3: linfocitos T; CD45R: linfocitos B; F4/80: Macrófagos; SMI-32: neurofilamentos no fosforilados; MBP: proteína básica de mielina; GFAP: astrocitos e Iba-1: Microglía. Se muestran imágenes representativas (20x) de cada grupo. . Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos.

Además, la determinación de los receptores  $CB_1$ ,  $CB_2$  o GPR55 se midió mediante microscopía confocal. Se encontró una mayor expresión de  $CB_2$  y GPR55 y una menor expresión de  $CB_1$  en el grupo de IL-12+IL-18 que en los ratones tratados con IL-12 (figura 34).



**Figura 34. Expresión de los receptores  $CB_1$  y  $CB_2$  y GPR55 en la zona lumbar de médula espinal.** (A) Cuantificación de expresión de receptores en ratones sanos, ratones TA-EAE inducida con células estimuladas con IL-12 y TA-EAE inducida con células estimuladas con IL-12 + IL-18. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos. (B) Inmunotinción de la zona lumbar de médula en cada uno de los grupos indicados.



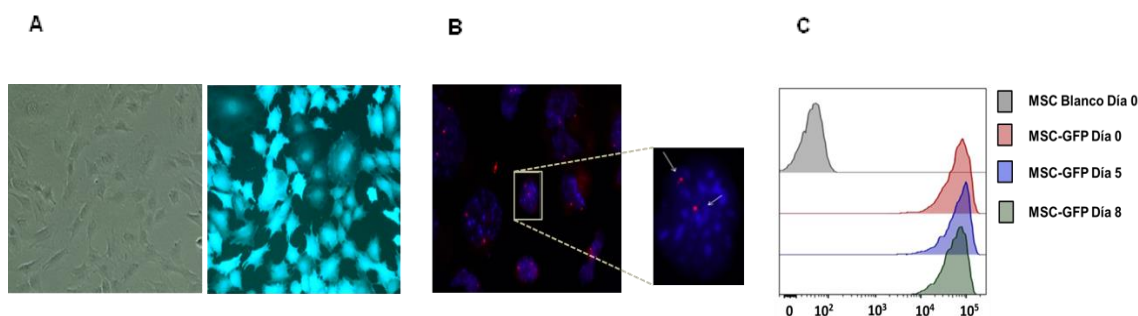
## 7. BIODISTRIBUCIÓN MSC

### 7.1 Infección de MSC de ratón C57BL/6 con lentivirus-GFP

Para poder estudiar la distribución de las MSC hubo que realizar un marcaje previo de las mismas. Para ello se llevó a cabo la transducción celular de las MSC con lentivirus-GFP, tras la cual se obtuvo un buen rendimiento y crecimiento celular como se muestra en la **figura 35A**.

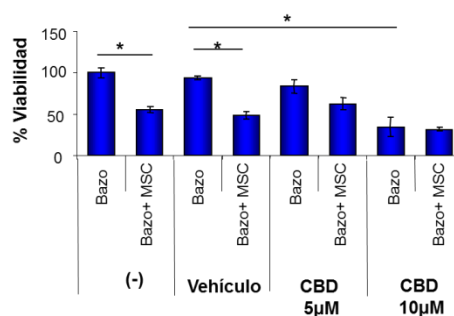
Mediante la técnica citogenética FISH (*hibridación fluorescente in situ*) se verificó que tras la infección las células seguían manteniendo los cromosomas sexuales XX intactos, y que estas células procedían de ratones hembra C57BL/6. Se usó una sonda de Kreatech (KBI-30505) que marca en rojo una región concreta en XqF1 y en verde todo el cromosoma Y (painting). El resultado refleja que en la muestra los cromosomas X hibridaron con la sonda específica y se visualizan dos señales rojas por núcleo, lo que es compatible con la fórmula sexual XX (**figura 35b**).

Además, se comprobó mediante citometría de flujo que las células habían sido infectadas y el gen GFP se había integrado en el genoma y no se perdía con las duplicaciones tras 8 días de cultivo (**figura 35C**).



**Figura 35. Muestra de MSC-GFP procedentes de hembras C57BL/6 e infectadas con lentivirus GFP. (A) Morfología cultivo celular bajo microscopio de contraste de fases y fluorescencia (10x). (B) FISH interfásico de MSC-GFP; se visualizan núcleos en interfase que muestran dos señales rojas que corresponde a la hibridación de los 2 cromosomas X. Estas células MSC-GFP fueron utilizadas como tratamiento en TA-EAE. (C) Análisis cuantitativo por citometría de flujo de la expresión de GFP tras la replicación de las MSC.** La positividad mantenida confirma su integración en el genoma. Se realizó con un citómetro MACSQUANT recogiendo la señal en el canal B1-A (con filtro de emisión de 530/30 nm).

Se estudió si el efecto antiproliferativo mostrado en las células MSC no se veía afectado por la infección de lentivirus-GFP. Para realizar esta comprobación se incubaron con concentraciones crecientes de CBD a 48h y se evidenció que las células MSC-GFP continuaban ejerciendo un efecto antiproliferativo sobre cultivos de bazo y que CBD no modificaba este efecto (**figura 36**).



**Figura 36. Viabilidad de células de bazo encefalitógenas en cocultivo con MSC-GFP e incubación con CBD.** Viabilidad celular por MTT en  $3 \times 10^5$  células de bazo cocultivadas con  $1.5 \times 10^4$  de MSC-GFP e incubadas con CBD a las concentraciones indicadas a 48 h. Análisis estadístico realizado mediante el test Kruskal Wallis y posterior corrección de Bonferroni. Valores  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$  se consideran estadísticamente significativos, bazo vs MSC + bazo.

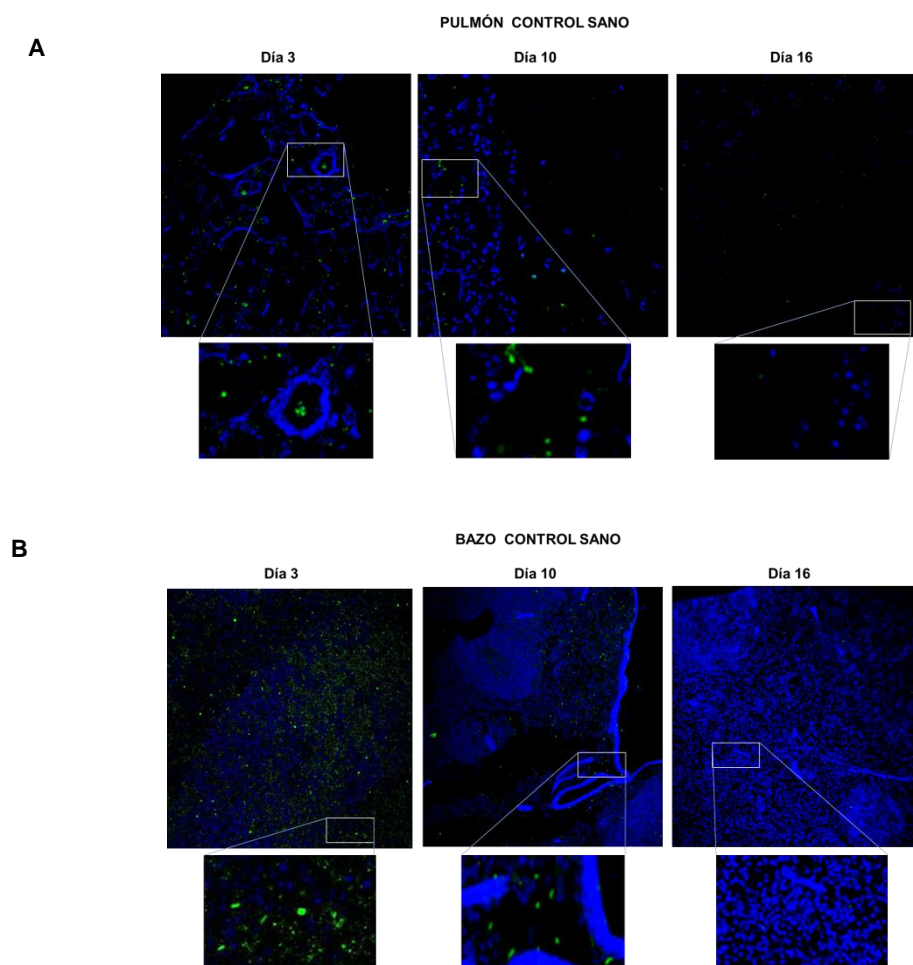
## 7.2 Biodistribución de MSC-GFP en animales control

### Análisis por PCR cuantitativa

Los resultados obtenidos tras el análisis realizado de los ADN genómicos, extraídos de los tejidos de hembras sanas a las que se les inoculó MSC-GFP, mostraron amplificación para el gen GFP en pulmón y bazo, resultando negativa la señal de amplificación en el resto de tejidos analizados (hígado, riñón, ganglios, corazón, médula espinal, cerebro y cerebelo). La amplificación en pulmón es positiva en los animales sacrificados a día 3 y a día 10, a diferencia de que en la muestra de bazo solo se encontró a día 3. A día 16 no hay amplificación de ninguno de los tejidos analizados. Los valores del control positivo de MSC-GFP son significativamente mayores que los encontrados en los tejidos con amplificación positiva.

### Estudio histológico

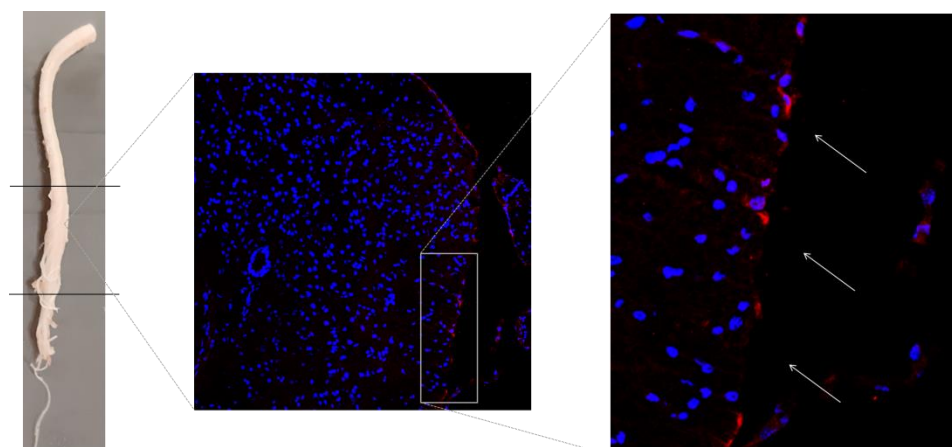
Mediante inmunofluorescencia se verificaron los resultados obtenidos en el análisis previo por PCR: MSC-GFP en pulmón a día 3 y 10, y en bazo a día 3 postinoculación. Además, mediante microscopía confocal se observaron MSC-GFP en bazo a día 10, no detectadas por amplificación del gen GFP. En la **figura 37** se muestran los resultados ya descritos.



**Figura 37. MSC se localizan en pulmón y bazo tras su inoculación i.v en animales control sanos.** Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia de **(A)** pulmón y **(B)** bazo y a diferentes días post-inoculación de MSC-GFP. Tinción con anticuerpo anti-GFP (verde) y tinción de los núcleos con TOPRO (azul).

### 7.3 Biodistribución de MSC-GFP en animales TA-EAE

En ratones TA-EAE tratados con MSC y sacrificados inmediatamente tras inoculación de las células, se detectó presencia de GFP en pulmón y corazón por qPCR, mientras que en ratones sacrificados a día 16 se encontró presencia de MSC-GFP en médula lumbar (**figura 38**). Estos resultados muestran que las MSC son capaces de atravesar la BHE en el modelo TA-EAE y llegar a zonas de inflamación de la médula espinal.



**Figura 38. Monitorización de células MSC-GFP inoculadas como tratamiento en ratones TA-EAE.** Imagen representativa de microscopía confocal de células MSC-GFP en la zona lumbar de la médula espinal de ratón TA-EAE tratado con MSC-GFP a días 0, 2, 7 y 9 y sacrificado a los 16 días p.i de las células encefalitógenas.

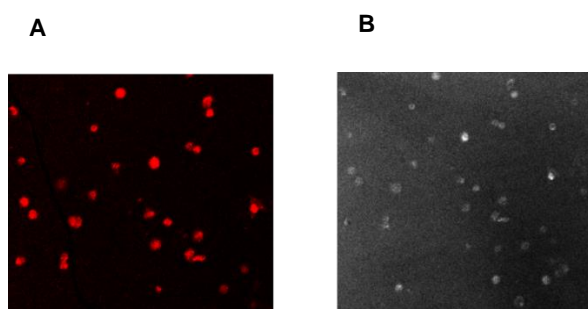
## 8. BIODISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS ENCEFALITÓGENAS EN ANIMALES TA-EAE

### 8.1 Marcaje de células encefalitógenas

Para estudiar el patrón circulatorio de las células encefalitógenas, se indujo TA-EAE en ratones hembra con células provenientes de ratones macho para detectar la región SRY del cromosoma Y mediante PCR y por FISH en microscopía confocal. No se encontró expresión del cromosoma Y por ninguna de las técnicas empleadas en ninguno de los órganos analizados a día 16 p.i.

Adicionalmente, se realizó un marcaje de células encefalitógenas con nanopartículas IR-820 nm cargadas con  $\text{Fe}^{2+}$  que pueden ser detectadas por resonancia magnética y microscopía confocal. Tras poner en contacto *ex vivo* las células encefalitógenas con NP se comprobó que las mismas se habían internalizado en las células y que no se perdían con el paso de las horas de cultivo (24, 48, 72 y 96 h). Hay que señalar, que también se añadió MOG<sub>35-55</sub> (25  $\mu\text{g/ml}$ ), IL-12 (25  $\text{ng/ml}$ ) e IL-18 (25  $\text{ng/ml}$ ), para reproducir las condiciones habituales de cultivo de las células encefalitógenas, previas a su inoculación para la inducción de TA-EAE. Además, se estudiaron diferentes condiciones de cultivo para ver si la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  (1/10 y 1/100) y la cantidad de NP (1/50 y 1/100) influían en la viabilidad celular y en la detección de las células marcadas.

Mediante microscopio confocal Leica SP5 se visualizaron las células marcadas, tanto en infrarrojo (**figura 39A**) como por reflexión (**figura 39B**).



**Figura 39. Imágenes representativas de células encefalitógenas con NPIR820  $\text{Fe}^{2+}$  internalizadas. (A) Detección en infrarrojo de la sonda IR-820 nm. (B) Detección de  $\text{Fe}^{2+}$  mediante reflexión.**

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de las siguientes condiciones de cultivo:

T1: células encefalitógenas sin NP.

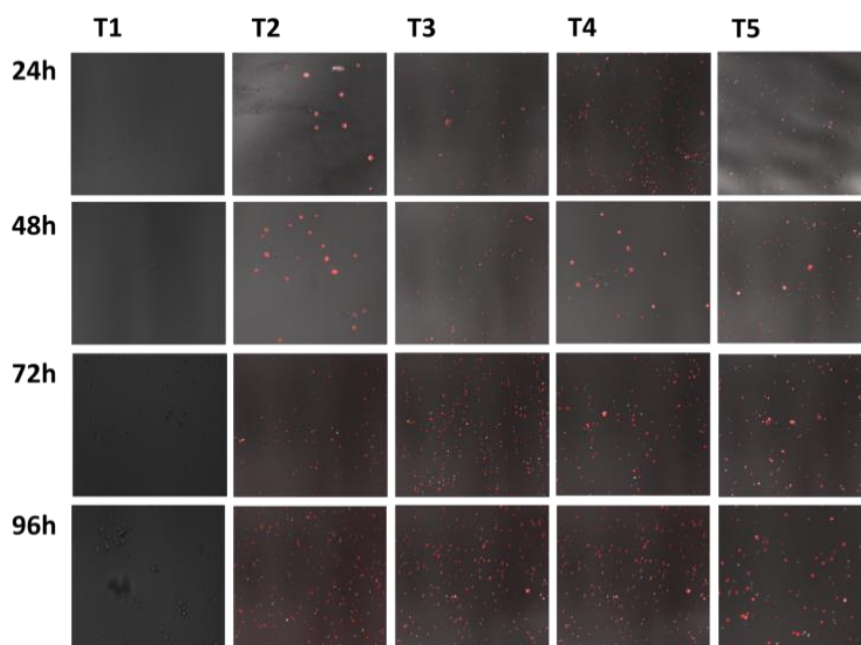
T2: células encefalitógenas con NP a concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  1/100 y a dilución 1/50

T3: células encefalitógenas con NP a concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  1/100 y a dilución 1/100

T4: células encefalitógenas con NP a concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  1/10 y a dilución 1/50

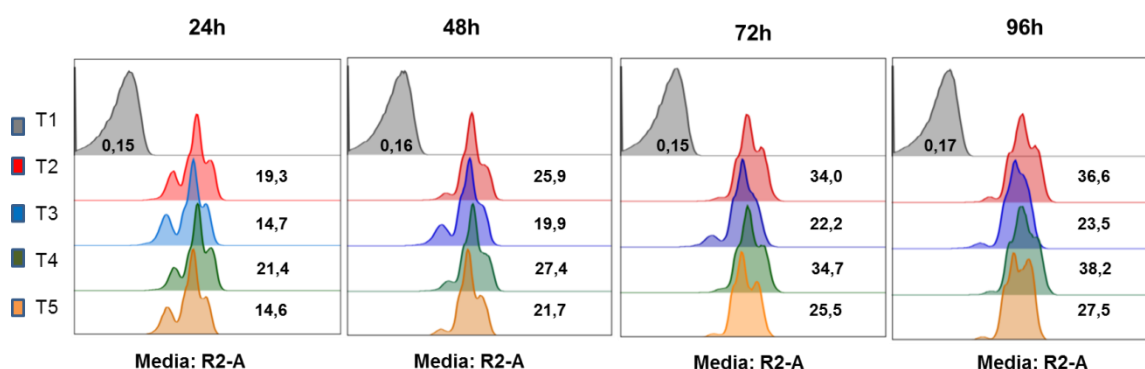
T5: células encefalitógenas con NP a concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  1/10 y a dilución 1/100

Para la detección de NP se usó microscopia confocal y citometría de flujo. En la **figura 40** se observan las células con NP mediante microscopia confocal (infrarrojo y reflexión). En las fotos correspondientes a las células control (T1) no se visualizan NP. En el resto de condiciones se aprecia una mayor internalización según aumenta el tiempo de exposición.



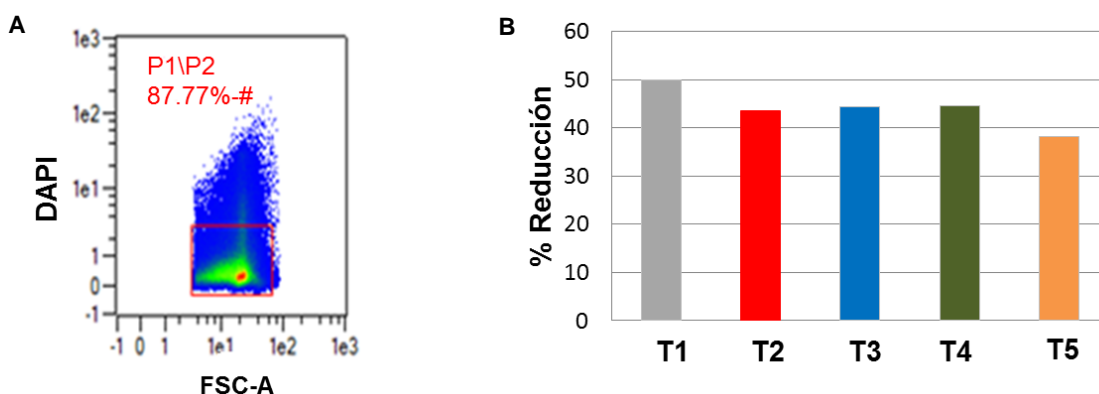
**Figura 40.** Imágenes obtenidas por microscopia confocal Leica SP5 donde se detectan células encefalitógenas con NP IR-820 nm cargadas con  $\text{Fe}^{2+}$  a diferentes concentraciones y tiempos de cultivo. Células cultivadas en medio específico de encefalitógenas y MOG<sub>35-55</sub> (25  $\mu\text{g/ml}$ ), IL-12 (25 ng/ml) e IL-18 (25 ng/ml).

Mediante citometría de flujo se verificaron los resultados ya descritos por microscopia confocal, como se muestra en la **figura 41**. La muestra control T1 no emite en IR, mientras que el resto si lo hacen y aumenta proporcionalmente con el tiempo de cultivo. Además, como era de esperar, las muestras con más concentración de NP son las que mayor emisión tienen.



**Figura 41. Las poblaciones de células NP+ fueron verificadas por análisis de citometría de flujo.** La figura muestra las medias de fluorescencia emitidas por las células encefalitógenas marcadas con NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  a distintas concretaciones en el canal R2-A, que recoge la emisión de las NP. Se observa que las células sin marcar no emiten (T1) y las marcadas con NP aumentan la emisión con el tiempo de cultivo y que, las muestras con más concretación (T2 y T4) son las que mayor emisión tienen.

Por otra parte, se comprobó la toxicidad celular a través de un estudio de viabilidad mediante citometría de flujo (**figura 42A**) y ensayo con *alamar blue* (**figura 42B**) para analizar el estado metabólico de las células tras la internalización de las NP. No existieron diferencias entre las distintas condiciones de cultivo.

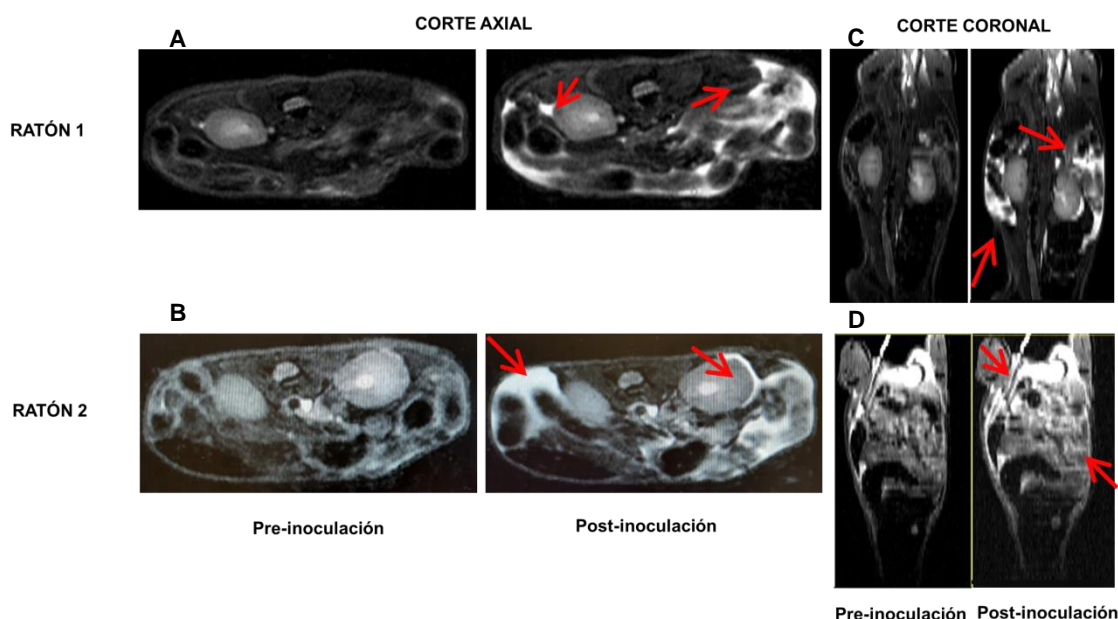


**Figura 42. Estudio de la viabilidad celular y citotoxicidad de NP IR820  $\text{Fe}^{2+}$  en células encefalitógenas.** (A) La población total de células encefalitógenas NP+ fue seleccionada a partir de un plano FSC/SSC (forward scatter/side scatter). Las células vivas fueron seleccionadas por la negatividad a DAPI. (B) Viabilidad celular por *alamar blue* en  $3 \times 10^5$  células incubadas con NP a distintas diluciones a 72 h.

## 8.2 Biodistribución de células encefalitógenas IR-820 nm $\text{Fe}^{2+}$

Una vez se comprobó que las NP se internalizaban en las células, no eran citotóxicas y se podían visualizar en IR y por reflexión, se procedió a su inoculación tras 72 h de cultivo con MOG<sub>35-55</sub> (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IL-12 (25  $\text{ng}/\text{ml}$ ) e IL-18 (25  $\text{ng}/\text{ml}$ ). La condición seleccionada fue T4, ya que fue la que mostró una mayor emisión. Se inocularon  $20 \times 10^6$  de células a dos animales por vía i.p y se realizó RM. En el momento de la inoculación, se apreció señal en la cavidad i.p (**figura 43**), pero en las posteriores RM, realizadas a 24 y 96 h, la señal había desaparecido (imágenes no mostradas).





**Figura 43. Imágenes *in vivo* de ratón C57BL/6 antes e inmediatamente después de la inoculación de células encefalitógenas marcadas con NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$ .** (A) y (B) cortes axiales, a la derecha antes de la inoculación y a la izquierda después de la inoculación. (C) y (D) cortes coronales, a la derecha antes de la inoculación y a la izquierda después de la inoculación. Las flechas indican la cavidad intraperitoneal donde se localizan las células tras la inoculación.

Se procedió a comprobar si estas células marcadas podían ser rastreadas mediante microscopía confocal en tejido *ex vivo* en los animales que habían sido inoculados en paralelo y en las mismas condiciones. Los resultados mostraron células marcadas con NP IR820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  a 24 y 48 horas p.i en SNC, ganglios y abazo.

Para comprobar estos datos y ampliar los días de estudio se planteó el siguiente experimento. Se establecieron 6 grupos, cada uno de ellos formado por 5 animales. A 3 ratones de cada grupo se les inoculó  $20 \times 10^6$  de células encefalitógenas marcadas con NP, a otro ratón NP y al último de ellos, células encefalitógenas sin marcar. Todas las células fueron estimuladas previamente con  $\text{MOG}_{35-55} + 25 \text{ ng/ml}$  de IL-12 y  $25 \text{ ng/ml}$  de IL-18 durante 72 h. Las NP se pusieron a la misma concentración en PBS. Se siguió el siguiente esquema para sacrificar a los animales y para ver la distribución de las células a distintos días.

Grupo 1: sacrificio a día 1 post-inoculación

Grupo 2: sacrificio a día 2 post-inoculación

Grupo 3: sacrificio a día 3 post-inoculación

Grupo 4: sacrificio a día 4 post-inoculación

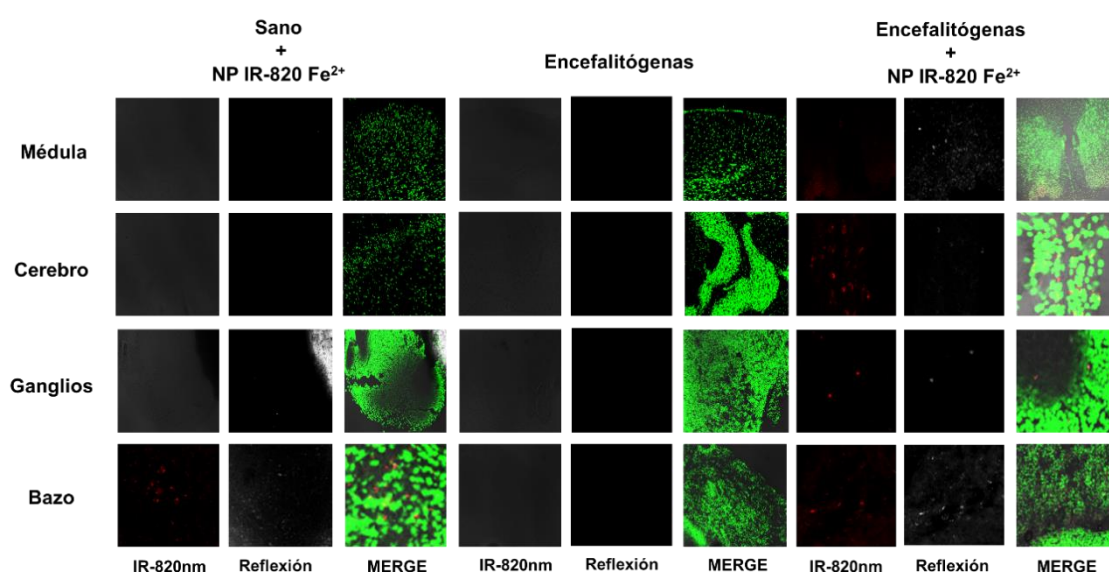
Grupo 5: sacrificio a día 7 post-inoculación

Grupo 6: sacrificio a día 24 post-inoculación

Tras el sacrificio, se extrajo sangre y los órganos seleccionados (cerebro, médula, bazo, ganglios, corazón, pulmón, hígado y riñón) para su posterior estudio por microscopía

confocal. Se guardó material de todos los órganos enumerados anteriormente para su inclusión en OCT. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (**figura 44**):

- Sanos con NP: Las NP se localizaron a día 1 y 2 p.i en bazo, pero la señal desapareció a día 3, 4 y 7. En el resto de órganos no se detectó señal.
- TA-EAE con células encefalitógenas sin marcar: No se detectó señal en ninguno de los órganos a ninguno de los días seleccionados.
- TA-EAE con células encefalitógenas marcadas con NP: Se localizaron a día 1, 2 y 3 en médula espinal, cerebro, bazo y ganglios. Por el contrario, no hubo señal en hígado, pulmones, corazón, riñones y sangre. A día 4 p.i continuaba la señal en bazo, pero en el resto de los órganos la señal se había perdido, mientras que a día 7 y día 24 p.i la señal de las células había desaparecido.



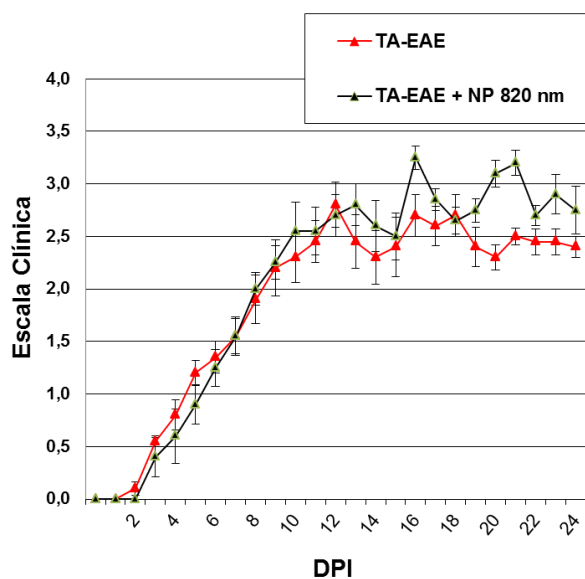
**Figura 44. Secciones de criostato de médula, cerebro, ganglios y bazo de ratones inoculados con células encefalitógenas con nanopartículas IR 820nm Fe<sup>2+</sup>.** Se detectó señal de NP IR-820 nm Fe<sup>2+</sup> tanto por reflexión como por fluorescencia en médula, cerebro, ganglios y bazo de animal inoculado con células encefalitógenas conjugadas con NP IR-820 nm Fe<sup>2+</sup>. El resto de órganos estudiados no presentaban NP IR-820 nm Fe<sup>2+</sup>. Animales sanos a los que se les había inoculado NP IR-820 nm Fe<sup>2+</sup>, solo mostraron señal en el bazo. En animales en los que se les inducía TA-EAE con células encefalitógenas que no tenían NP no fue observada ninguna señal de fluorescencia ni reflexión. Imágenes de fluorescencia y reflexión determinadas por microscopía confocal (20x).

### 8.3 Efecto de las nanopartículas IR-820 nm Fe<sup>2+</sup> en las células encefalitógenas.

Para comprobar que el marcaje con NP IR-820 nm Fe<sup>2+</sup> no afectaba a la capacidad encefalitógena de las células se establecieron dos grupos de tratamiento. Al primer grupo se le inocularon células encefalitógenas activadas con 25 µg/ml de MOG<sub>35-55</sub>, 25ng/ml de IL-12 y 25 ng/ml de IL-18 durante 72 h (n=5). Y al segundo grupo se le inocularon células a las que se le habían añadido NP al cultivo en la condición T4, descrita anteriormente (n=5). Durante 24 días se evaluó diariamente la escala clínica de



los animales, comprobando que la capacidad encefalitógena no se ve afectada por el marcaje con NP (figura 45).



**Figura 45. Signos clínicos de TA-EAE.** Se inocularon  $20 \times 10^6$  de células encefalitógenas activadas con 25  $\mu\text{g/ml}$  de MOG<sub>35-55</sub>, 25 ng/ml de IL-12 y 25 ng/ml de IL-18 durante 72 h. Además, se añadieron NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$ , en la condición T4, al cultivo de células que se iban a inocular en el segundo grupo de tratamiento. (n=5)

En la actualidad hay múltiples modelos animales de EM, pero ninguno de ellos consigue representar todas las características de la EM. Aunque existen diferencias entre el modelo animal y la EM, también hay muchas coincidencias en la patología y los signos clínicos de la enfermedad y, gran parte de la comprensión sobre el proceso autoinmune e inflamatorio es gracias al modelo EAE. Este modelo ha permitido el desarrollo de terapias para el tratamiento de la EM (Robinson y cols., 2014).

El modelo empleado en el presente trabajo fue el modelo de TA-EAE, en el cual la inducción se consigue inoculando células activadas contra epítomos de la mielina. Una ventaja de este modelo respecto al modelo activo es que no se aplica toxina pertussis, eliminando así el uso de este factor de virulencia y haciéndolo más espontáneo. Otra característica de este modelo es que las células que proceden de bazo y ganglios de animales EAE pueden ser manipuladas *in vitro*, permitiendo su estudio antes de ser transferidas (Mannara y cols., 2012) y su marcaje para ser monitorizadas en los animales receptores (Stommes y Goverman., 2006).

Comparando los modelos activo y pasivo de EAE observamos que, tras la inducción activa de la enfermedad, se consiguió una incidencia del 100%, los animales enfermaron alrededor del día 11 p.i y alcanzaron un grado máximo de enfermedad de 4 el día 16-17 p.i. En el pasivo los animales enfermaron alrededor del día 4-5 p.i y alcanzaron un grado máximo de enfermedad de 3 el día 7 p.i, obteniendo también una incidencia del 100%. Según otras publicaciones, los animales EAE de la forma activa enferman más tarde que los TA-EAE, pero alcanzan grados más bajos (Mannara y cols., 2012). Estas discrepancias pueden ser debidas a que la cantidad de MOG<sub>35-55</sub> y de *Mycobacterium tuberculosis* empleadas en EAE en los experimentos son distintas. Otra diferencia es el día en el que comenzaron los signos clínicos, ya que en nuestro modelo empezaron a ser valorables a día 4-5 p.i y lo habitual es que sea a día 8 p.i (Mannara y cols., 2012; Strommes y Goverman., 2006).

Dado los resultados previos obtenidos por otros grupos con el tratamiento con CBD (Kozela y cols., 2011) y con MSC (Mittra y cols., 2015) en el modelo activo de EAE, se quiso valorar por primera vez si el uso de CBD, MSC y la combinación de ambos tratamientos proporcionaría un efecto aditivo en la reducción de los signos clínicos en el modelo TA-EAE.

### Obtención y caracterización de MSC

Tras la extracción de las MSC de tibia y fémur de ratones hembra C57BL/6 se comprobó que cumplían los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici y cols., 2006). Los resultados obtenidos mostraron que las células eran adherentes, formadoras de colonias y expresaban los marcadores de superficie definidos para las MSC. Además, el inmunofenotipo de las MSC fue estable durante su expansión sin variar en los pases de cultivo. Estos resultados, junto con la capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica indicaron que MSC obtenidas obedecían a los

criterios marcados, como otros autores han descrito (Baustian y cols., 2015; Hu y cols., 2018). El único criterio que no se consiguió reproducir fue la diferenciación a condrocitos.

### **Papel del CBD y MSC sobre la viabilidad de las células encefalitógenas: estudio *in vitro***

Dado el papel atribuido al sistema cannabinoide en las células madres neurales cabía suponer la relevancia de este sistema en las células mesenquimales de médula osea (Galve-Roperh y cols., 2013; Prenderville y cols., 2015). Debido al potencial clínico del CBD, éste podría interactuar con las MSC y modificar su función, además de promover su migración a zonas de inflamación y con daño tisular (Kamali y cols 2019).

Se realizaron distintos estudios *in vitro* para observar como influían los tratamientos con CBD y MSC sobre las células encefalitógenas que son las responsables del desarrollo de la TA-EAE y de esta manera poder predecir el posible comportamiento de estos tratamientos en el modelo.

En este trabajo se ha comprobado que en las células encefalitógenas hay expresión de receptores CB<sub>1</sub> y GPR55 mayoritariamente, aunque también se ha detectado la presencia del receptor CB<sub>2</sub>, aunque en menor proporción. Además, se observó que GPR55 y CB<sub>2</sub> coexpresaban en células encefalitógenas. Esta coexpresión podría estar relacionada con que el ARNm de ambos receptores se regula en paralelo, como ha descrito otro grupo (Pietr y cols., 2009).

Se evaluó la presencia de estos receptores cannabinoides, por citometría de flujo y microscopía confocal, en las MSC y se comprobó que los niveles eran muy bajos para todos ellos, resultado en línea con otro grupo (Köse y cols., 2018).

Se observó que la viabilidad de las células encefalitógenas en presencia de CBD 10  $\mu$ M disminuía tanto a 48 h como a 72 h de cultivo. Este efecto estaría en concordancia con la inducción de apoptosis en monocitos y linfocitos provocada por el CBD a través del estrés oxidativo y del aumento de los niveles de ROS (McKallip y cols., 2006; Wu y cols., 2010). Experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraron que el CBD a concentraciones de 5 o 10  $\mu$ M aumentaba significativamente la apoptosis temprana en células encefalitógenas (González-García y cols., 2017). Por el contrario, cuando las MSC se ponían en cultivo junto con CBD, la viabilidad celular no se veía afectada a ninguna de las concentraciones.

Se estudió *in vitro* cómo afectaba el CBD al cultivo de encefalitógenas y en cocultivo con MSC. Se observó una disminución de la viabilidad celular cuando las células encefalitógenas se encontraban en cocultivo con las MSC. Esta disminución se perdía cuando se adicionaba CBD a los cultivos, posiblemente por el efecto apoptótico de CBD sobre las células encefalitógenas.

### **Efecto del CBD sobre la diferenciación adipogénica y osteogénica de las MSC**

Al estudiar el efecto del CBD sobre la capacidad de diferenciación de las MSC se observó una disminución de la diferenciación adipogénica con CBD 8  $\mu$ M, y un aumento de la diferenciación osteogénica a 5 y 8  $\mu$ M. Hay autores que demuestran que los cannabinoides estimulan la osteogénesis e inhiben la diferenciación adipogénica (Idrid,

2012; Ruhl y cols., 2018). Este incremento en la formación de osteocitos ha sido descrito también por otros autores (Kamali y cols., 2019). Los resultados obtenidos muestran que CBD actúa sobre la capacidad de diferenciación de las MSC, pero la vía de actuación de este cannabinoide es desconocida actualmente (Bih y cols., 2015). La baja expresión de los receptores de la vía clásica (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) y GPR55 encontrada en estas células y el efecto sobre la diferenciación, refuerza la idea de la existencia de otra vía de actuación de CBD.

### **Elección de dosis de MSC**

Como se ha indicado anteriormente las MSC, poseen propiedades neuroprotectoras e inmunomoduladoras (Barati y cols., 2019), son relativamente accesibles, crecen fácilmente en cultivo, y tienen alta capacidad para migrar hacia los tejidos dañados (Cogle y cols., 2004). Todo ello las hace buenas candidatas para tratar enfermedades como la EM (Zhang y cols., 2005; Zappia y cols., 2005). Estas células son capaces de expresar un amplio abanico de factores de crecimiento y citocinas (Caplan y Correa, 2011). Las MSC expresan moléculas de señalización dependiendo del entorno en el que se encuentran y, en función del mismo, son capaces de responder a un amplio espectro de señales. Algunas investigaciones sostienen que las MSC son células inmunoprivilegiadas debido a que expresan MHC-I pero poseen una baja expresión MHC-II (Tse y cols., 2003; Patel y cols., 2008; De Miguel y cols., 2012), lo que les conferiría una ventaja cuando se inoculan en el receptor.

En el presente trabajo se estudió el comportamiento de MSC en el modelo TA-EAE. Los resultados obtenidos sugieren que, cuando se inoculaban 0.5 x 10<sup>6</sup>/día de MSC a días 0 (inducción de la enfermedad) y 2, o a días 7 y 9 (comienzo de los síntomas) por vía i.v., se observaba una ligera mejoría de los signos sin llegar a ser significativa. Manteniendo la dosis diaria de 0.5 x 10<sup>6</sup> y aumentando el número de días de inoculación a seis (días 0, 2, 7, 9, 14 y 16), con una dosis final total de 3 x 10<sup>6</sup> de MSC, se produjo una mayor reducción de los signos, tanto en la media de grado máximo, como en la media de acumulación de la escala clínica.

### **Elección de dosis CBD**

Uno de los objetivos de los fármacos actuales en EM es la regulación del sistema inmunológico, por lo que el perfil antiinflamatorio del CBD hace del mismo una herramienta atractiva para evitar los efectos provocados por la neuro-inflamación (Klein., 2005; Walter y Stella, 2004). Además, se ha observado que ejerce un efecto neuroprotector (Sánchez y García-Merino, 2012; Fernández-Ruiz y cols., 2015b) y promueve la remielinización (Arevalo-Martin y cols., 2003). Se ha demostrado que mejora la sintomatología en modelos de EAE, al disminuir la inflamación, la actividad microglial y los infiltrados inflamatorios en SNC (Kozela y cols., 2011). Por otro lado, frena la apoptosis en los procesos neurodegenerativos (Giacoppo y cols., 2015). Todo lo descrito anteriormente, sugiere que el CBD puede tener posibilidades terapéuticas en la EM.

En estudios previos realizados en el modelo activo de EAE y empleando una dosis de 5 mg/Kg de CBD, se observó una mejora en la clínica de la enfermedad, acompañada de una disminución del daño axonal y de la inflamación, así como de la activación microglial (Kozela y cols., 2011). En esta investigación se empleó por primera vez CBD como

tratamiento de la TA-EAE y se comprobó que dosis relativamente bajas de 5 a 10 mg/Kg disminuyen los signos clínicos y que el aumento de dosis a 50 mg/Kg producía una marcada mejoría.

### **Comparativa MSC y CBD**

Al aumentar los días de inoculaciones de MSC a seis días e incrementar el tratamiento de CBD a 50 mg/kg se observó una reducción significativa en ambos tratamientos, tanto en la media de grado máximo, como en la media de acumulación de signos clínicos, siendo mayor el efecto producido por CBD.

Uno de los objetivos principales de este trabajo era observar el efecto combinado de CBD y MSC. Los resultados evidenciaron que el tratamiento con CBD y CBD + MSC reducen de manera significativa tanto la media de grado máximo como la media de acumulación de signos clínicos, siendo mayor el efecto del CBD administrado solo. Por otro lado, el efecto de las MSC sobre la reducción de los signos clínicos es menor que el producido por los otros tratamientos.

El grupo tratado con CBD + MSC mostró una mejoría de los signos clínicos respecto al grupo no tratado y al grupo tratado solo con MSC, pero una peor evolución que cuando se trataba solo con CBD. Se evidenció, por tanto, un efecto terapéutico aditivo del CBD sobre la acción de las MSC, mientras que las MSC ejercerían un efecto negativo sobre la acción del CBD sobre las células encefalitógenas.

### **Resonancia Magnetica**

El CDA es una medida cuantitativa de la magnitud de la capacidad de difusión de las moléculas de agua a través del tejido y se ha establecido una relación del CDA con la desmielinización y la pérdida axonal en la EM (Rovaris y cols., 2005; Inglese y Bester, 2011).

Los ratones tratados con MSC exhibían menor CDA en el hipocampo izquierdo y, aunque no llegó a ser significativo, existía una tendencia a la disminución de CDA en el resto de áreas cuando se comparaban con los ratones no tratados. Estos resultados concuerdan con la mejora en los signos clínicos de los animales tratados con MSC. Estudios realizados en rata Lewis en la que se inducía TA-EAE mostraban un aumento de la activación microglial y astrogial y en la expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias en el hipocampo 30 y 90 días postinoculación. El factor de crecimiento nervioso y los niveles de ARNm del factor neurotrófico derivado del cerebro también se elevaron significativamente en esas investigaciones. Todo ello podría implicar mecanismos neurodegenerativos en el hipocampo durante las recaídas (Kurkowska-Jastrzębska y cols., 2013). En el modelo EAE también se ha descrito reactividad microglial severa generalizada y neurodegeneración e infiltración de linfocitos CD3+ en regiones adyacentes a membranas meníngeas inflamadas interpuestas entre la cara ventral del hipocampo y la cara dorsal de la mitad del cerebro (Kyran y cols., 2018).

Los hallazgos encontrados en la RM están en concordancia con la mejoría de la clínica del grupo tratado con CBD 50 mg/Kg diariamente, en el que se observó menor CDA a nivel del subículo ventral comparado con los ratones TA-EAE no tratados. El subículum es el componente más inferior de la formación del hipocampo, una de las zonas

cerebrales más sensibles al daño neuronal, reportado como un evento temprano en EAE (Ziehn y cols., 2010; Kurkowska-Jastrzebska y cols., 2013). Algunas de sus funciones son el procesamiento de información sobre el espacio, el movimiento y la memoria (O'Mara, 2005).

Los hallazgos de la RM, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los CDAs de los grupos CBD+MSC vs TA-EAE.

### Estudio Histológico

Para el estudio histológico se emplearon muestras de dos experimentos independientes. Tras la valoración de la escala clínica, los animales fueron sacrificados y se realizó el estudio histológico. Se valoraron linfocitos T (CD3), macrófagos (F4/80) desmielinización (MBP), daño axonal (SMI-32), microglía (Iba-1) y astrocitos (GFAP).

En el grupo tratado con MSC durante seis días se apreció una disminución del número de linfocitos T, macrófagos, astrocitos y menor daño axonal que el grupo no tratado. En cuanto a la desmielinización hay un ligero descenso, pero no es estadísticamente significativo. La expresión de Iba-1 aumenta tras el tratamiento. Estos datos proporcionan evidencia de que el trasplante de MSC puede modular la progresión de la TA-EAE. Los datos obtenidos concuerdan con estudios realizados por otros grupos (Gerdoni y cols., 2007; Uccelli y cols., 2002; Zappia y cols., 2005) en los que se evidencia la acción de las MSC, inoculadas por vía i.v en el modelo EAE antes del inicio de la enfermedad, bloqueando el desarrollo de los síntomas. Las MSC podrían modular la respuesta inmune (Gerdoni y cols., 2007) y disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias, desviando la respuesta inmune de un perfil Th1 mayoritariamente proinflamatorio, a un perfil Th2 antiinflamatorio (Bai y cols., 2009; Bai y cols., 2012). En cuanto a la reducción en el nivel de GFAP, otros autores ya describieron que el tratamiento con MSC provocaba un descenso en la expresión del ARN para GFAP, que forma parte de los astrocitos (Bai y cols., 2012). Este descenso es originado por la liberación de factores tróficos por parte de las MSC, entre los que se encuentra el HGF que promueve, junto con las propias células la bajada de expresión de citocinas proinflamatorias y el aumento de las antiinflamatorias. Además, HGF también está implicado en la remielinización. Las MSC también están implicadas en el desarrollo y la migración de oligodendrocitos y neuronas (Sargent y Miller, 2016).

La aplicación de MSC podría estar relacionada con la modulación de la microglía a un perfil M2 con efecto antiinflamatorio y neuroprotector, y disminuyendo el perfil M1, que genera respuesta proinflamatoria. Hay estudios que respaldan esta hipótesis, como algunos autores que describen que los exosomas derivados de MSC atenúan la inflamación y la desmielinización del SNC en el modelo de rata EAE mediante la regulación de la polarización de la microglía (Li y cols., 2019). Como algunos autores han descrito la microglía tiene dos perfiles, uno inflamatorio o M1 y otro antiinflamatorio o M2 (Pan J y cols., 2015). El aumento observado de Iba-1 en el grupo tratado con MSC, podría ser explicado por un descenso de la microglía M1 y un aumento del perfil antiinflamatorio M2. Para confirmar esta posibilidad habría que haber realizado un doble marcaje con Iba-1 y marcadores de M1 (CD16/32) o marcadores de M2 (CD206).

En el tratamiento con CBD 50 mg/kg diario, la mejoría significativa de los signos clínicos fue acompañada de una disminución significativa de las células T, macrófagos, Iba-1,



daño axonal y desmielinización. Sin embargo, no se observó modificación en la expresión de GFAP.

El tratamiento con CBD podría actuar disminuyendo la infiltración de células inflamatorias en el SNC, que provocaría una reducción de la desmielinización y la pérdida axonal, como otros autores han mostrado (Arevalo-Martin y cols., 2003; Feliú y cols., 2015). La disminución de la activación de la microglía y el nivel de la misma en los animales tratados con CBD, concuerda con la administración de otros cannabinoides estudiada por otros autores (Mecha M y cols., 2018). Se ha relacionado la supresión de la microglía con reducción de la gravedad clínica y de la patología de la enfermedad (Nissen y cols., 2018) y con disminución de la neuroinflamación (Goldmann y cols., 2013). Otros estudios evidencian que la microglía ni promueve ni inhibe la degeneración neuronal y remielinización del axón (Hilla y cols., 2017; Wimmer y cols., 2019). En este grupo tratado con CBD se observa una relación de la disminución del daño axonal con la disminución de la microglía.

Los estudios de inmunofluorescencia reflejaron que no existían diferencias entre el grupo tratado con CBD + MSC y el grupo TA-EAE sin tratar. Se cuantificó un aumento significativo del número de macrófagos respecto al resto de grupos y no se encontraron diferencias en el número de infiltrados CD3 respecto al grupo no tratado, lo que implica una elevada inflamación. Se observó una ligera disminución no significativa del daño axonal respecto al grupo TA-EAE. La expresión de Iba-1 estaba reducida respecto al grupo tratado con MSC y la expresión de GFAP estaba considerablemente elevada en comparación con todos los grupos, lo que indicó una elevada inflamación (Kassubek y cols., 2017). Hay estudios que identifican a los astrocitos como componentes claves de la inmunopatología en el EM y la EAE, conduciendo a procesos duales, que pueden promover un daño mayor o contribuir a la reparación (Brambilla R., 2019). Esta reacción astrocitaria como efecto del tratamiento al uso combinado de CBD y MSC podría estar relacionada con el daño, pero los valores son mucho mayores que en el grupo sin tratamiento. No se puede descartar que este aumento en GFAP, generado por el efecto conjunto de CBD y MSC, esté relacionado con la regeneración como describen otros autores, que postulan que la formación de cicatrices de astrocitos ayuda a la regeneración axonal (Anderson y cols., 2016).

Los resultados obtenidos mediante estudio histológico no fueron concordantes con la escala clínica en este grupo, en el que se esperaba encontrar menor infiltración, daño axonal, y desmielinización. Hay que considerar que el tamaño muestral del grupo es reducido (n=5), lo cual puede limitar la obtención de diferencias estadísticamente significativas.

### **Papel de las MSC en el modelo TA-EAE: estudio *in vivo***

El efecto terapéutico de la inoculación de las MSC en el modelo animal fue menor de lo esperado. Una posible explicación es que las MSC fuesen inducidas a apoptosis por acción sinérgica de IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  producido por las células encefalitógenas (Li y cols., 2019). Estos estudios sugieren que las dos citocinas estimulan la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y, en consecuencia, la generación de óxido nítrico (NO), que se requiere para la apoptosis de las MSC de ratón. Otros estudios apoyan estos hallazgos (Liu y cols., 2011), y añaden que las células del receptor, específicamente las

células T, regulan la regeneración de los tejidos llevada a cabo por las MSC, de forma que correlacionan negativamente el aumento de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  con la regeneración ósea mediada por MSC.

Ya se han llevado a cabo ensayos clínicos en pacientes con MSC en EM, los cuales incluían pacientes con EMPP, EMSP y EMRR (Dulamea., 2015) a los que se les administraban células de forma intratecal o i.v, cuya dosis y número de administraciones variaba entre los diferentes ensayos. Los resultados muestran que el trasplante con MSC induce efectos inmunomoduladores inmediatos y que, además, el procedimiento es clínicamente factible y relativamente seguro (Karussis y cols., 2010). El principal problema es el pequeño número de pacientes incluidos en esos ensayos, lo que limitó la valoración de los resultados obtenidos. Por otro lado, era recomendable la existencia de un protocolo a seguir en el tratamiento con MSC en pacientes de EM, donde se detallase el procedimiento para el cultivo celular, la dosis, vía de administración y posibles efectos adversos causados por el tratamiento. Expertos en la materia formaron el “International Stem Cells Transplantation Study Group” (IMSCCTSG) y en el 2010 se publicó un documento que contenía el consenso establecido (Freedman y cols., 2010). Tras lo cual se realizaron otros ensayos que arrojaron información sobre la seguridad, la tolerancia de las MSC y la estabilización / mejoría leve de la enfermedad. Aún están sin resolver cuestiones sobre la biodistribución de estas células al SN en humanos. Otra cuestión importante es llevar a cabo ensayos aleatorios multicéntricos que viertan más información de seguridad y eficacia de MSC como tratamiento de la EM.

### **Papel del CBD en el modelo TA-EAE: estudio *in vivo***

El interés actual en el estudio del potencial terapéutico del (CBD), en los trastornos neurológicos ha dado lugar a múltiples estudios preclínicos, los cuales muestran que puede producir efectos beneficiosos en pacientes con EM, pero es necesaria una confirmación adicional de estudios clínicos bien diseñados (Mannucci y cols., 2017). Además, uno de los problemas actuales es que se desconoce como actúa el CBD a nivel molecular y sus dianas terapéuticas, entre las que se están estudiando canales iónicos, receptores, transportadores y enzimas (Bih y cols., 2015). Por lo que a medida que surgen pruebas de los efectos del CBD en las enfermedades neurológicas, aumenta la necesidad de fijar objetivos moleculares mediante los cuales ejerce su papel terapéutico.

En muchos países está disponible nabiximols (THC/CBD) para el tratamiento de la espasticidad en la EM, siendo un fármaco efectivo, en general bien tolerado, con bajos efectos psicoactivos y con un perfil de toxicidad aceptable (Keating, 2017).

En epilepsia se han realizado ensayos clínicos fase I, II y III en los que se han dado dosis que van desde 2 mg/kg hasta 50 mg/kg observándose mejoría de los síntomas clínicos. Estos estudios también hacen referencia a efectos adversos no graves, sobre todo en combinación con determinados fármacos (valproato), mientras que empleado de forma concomitante con otras terapias para tratar la epilepsia el CBD actúa como adyuvante. En general, estos resultados fomentan el uso de CBD en combinación con otros fármacos para el tratamiento de la epilepsia (Silvestro y cols., 2019). Estos hallazgos se pueden extrapolar y sugieren el tratamiento con CBD como tratamiento concomitante con otros fármacos modificadores de la EM.



## Tratamiento combinado CBD y MSC en el modelo TA-EAE

Los estudios *in vitro* revelaron que la viabilidad de las células encefalitógenas disminuía en presencia de MSC, efecto esperable según los mecanismos de acción de las MSC (Sun y cols., 2010). Cuando se añadía CBD, tanto el cultivo de encefalitógenas solas, como el cocultivo con MSC disminuían la viabilidad de las células encefalitógenas, no encontrándose diferencias significativas producidas por las MSC sobre las encefalitógenas en presencia de CBD.

Según la literatura, se ha evidenciado que el CBD reduce el estrés oxidativo y restaura la adipogénesis y la condrogénesis de las MSC, por lo que podría ejercer efectos inmunosupresores en las MSC (Ruhl y cols., 2018). Se han realizado ensayos de migración *in vitro* que demostraron que el CBD aumentó considerablemente la migración de las MSC a lesiones óseas y se cuantificó una expresión regulada al alza de marcadores osteogénicos en presencia de CBD (Kamali y cols., 2019). Esto estaría en concordancia con el aumento en la diferenciación osteogénica observada en los experimentos *in vitro* a una concentración de 8  $\mu$ M, pero, por el contrario, se dio un descenso de la diferenciación adipogénica a esa misma concentración. En ambos casos, se reflejó que el CBD ejerce una regulación sobre las MSC, a pesar de la poca expresión de los receptores cannabinoides en estas células. Ello hace pensar que el CBD ejerce su acción a través de receptores a día de hoy desconocidos.

El efecto del CBD sobre las células encefalitógenas disminuyó cuando se inoculan MSC a los animales TA-EAE. Una posible explicación sería que parte del CBD actúe sobre las MSC y que hubiese menos cantidad de CBD disponible para ejercer efecto antiinflamatorio sobre las células encefalitógenas, y los efectos desencadenantes en el modelo animal. Lo que estaría en consonancia con efecto potenciador sobre las MSC que se observó en el grupo tratado con CBD + MSC, en el que se apreció una mejoría de la clínica en comparación con el grupo tratado únicamente con MSC. Una posible comprobación de esta hipótesis sería aumentar la dosis de CBD administrada y ver si este hecho implica mayor cantidad disponible para afectar a la viabilidad de las células encefalitógenas y potenciar el efecto de las MSC en el modelo animal.

## Optimización del modelo Animal

Con el objetivo de optimizar nuestro modelo TA-EAE, para que fuese más homogéneo y los animales desarrollasen un mayor grado de enfermedad, se realizaron estudios sobre las condiciones de activación de las células encefalitógenas para conocer como afectaban determinados factores sobre las mismas.

El primer factor a considerar fue el tiempo de activación en cultivo. Los resultados mostraron que es necesario un tiempo mínimo para la activación de las células encefalitógenas. En el momento de la extracción de células de animales EAE, estas presentaban un perfil activado (elevada expresión de CD69 y elevada producción de IL-2), pero baja producción de IFN- $\gamma$ . Tras cultivarlas con MOG<sub>35-55</sub> e IL-12, las células mostraban que a las 60 h de cultivo este perfil activado disminuía y comenzaba a subir de nuevo a partir de las 72 h en cultivo. Además, la producción de IFN $\gamma$  aumentaba significativamente con el transcurso de las horas, siendo su pico de producción máximo a las 96 h. Hay que señalar que a las 96 h también se veía afectada la viabilidad celular, por lo tanto, se seleccionó el tiempo de 72 h para la inoculación de las mismas en los

animales receptores, aunque a 96 h la activación fuese máxima. Hay autores que describen que no existen diferencias en la inducción de EAE entre células que han estado 72 h o 96 h en cultivo (Strommes y Goverman, 2006).

Por citometría de flujo, se observó inicialmente una población de células (relacionada con el perfil activado) que desaparecía cuando no se añadía el estímulo (MOG<sub>35-55</sub> e IL-12). Esto evidencia que es necesario el uso del mismo para conseguir una población activada. Ya se sabía que IL-12 es necesaria para el desarrollo de células Th1 (Athie-Morales y cols., 2004). Otro dato que aporta este experimento es que las células tras ser extraídas del animal EAE necesitan un tiempo para su activación, ya que a 60 h de cultivo la población con perfil activado desaparecía y se recuperaba a las 72 h, siendo máxima a las 96 h.

Los resultados obtenidos en otro experimento, en el que se estudia el efecto de dos concentraciones distintas de MOG<sub>35-55</sub> (25 µg/ml o 50 µg/ml) en combinación con IL-12 o IL-12 + IL-18 muestran que, el cultivo con MOG<sub>35-55</sub> en presencia de IL-12 e IL-18 inducen sinérgicamente la producción de IFN-γ, como ya mostraban otros grupos de investigación (Yoshimoto y cols., 1998; Ito y cols., 2003). No existieron variaciones en el porcentaje de expresión de CD69, ni en la producción de IL-2 entre añadir al cultivo una sola citocina o la combinación de ambas. En cuanto a la dosis de MOG<sub>35-55</sub>, aunque se apreció un leve aumento en la producción de IFN-γ, no se observaron cambios respecto a la expresión de CD69 e incluso menos producción de IL-2 en la condición con IL-18. Además, la viabilidad celular disminuyó en los grupos tratados con 50 µg/ml MOG<sub>35-55</sub>, por lo que se descartó usar esta concentración en los siguientes experimentos.

Para estudiar en nuestro modelo de TA-EAE el efecto que tenía esta diferencia en la producción de IFN-γ que se producía al añadir IL-18 al cultivo, se diseñó un experimento *in vivo*. Se seleccionaron las condiciones con 25 µg/ml de MOG<sub>35-55</sub> + IL-12 con y sin IL-18 y se valoró la escala clínica de ambos grupos y de un grupo control (sanos) durante 58 días p.i. Se evidenció que el grupo tratado con ambas citocinas alcanzaba un mayor grado de la enfermedad durante los 20 primeros días, para después igualarse con el grupo tratado solo con IL-12. Otros autores describen que, los grupos tratados con las dos citocinas alcanzaban más grado y lo mantenían en el tiempo en comparación con el grupo tratado solo con IL-12 (Ito y cols., 2003).

Mediante inmunofluorescencia se realizó el estudio comparativo de daño axonal (SMI32), desmielinización (MBP), infiltración (CD3 y CD45R), macrófagos (F4/80), astrocitos (GFAP) y microglía (Iba-1) entre los 3 grupos (sanos, células cultivadas con IL-12 y cultivadas con IL-12 + IL-18). Se observó una mayor infiltración, daño axonal y desmielinización en la médula espinal de ratones que habían sido inoculados con células encefalíticas activadas con la combinación de IL-12 e IL-18, en comparación con los que se habían inoculado con células tratadas únicamente con IL-12 y con los sanos. En relación con los astrocitos hubo diferencias entre el grupo de animales sanos y los TA-EAE, sin encontrarse discrepancias entre los grupos tratados con IL-18 y sin ella. No hubo diferencias en la microglía entre ninguno de los grupos. Estos resultados mostraron que, aunque no había disparidad en la escala clínica de los dos grupos TA-EAE a día 58 p.i, si existía a nivel de daño axonal, infiltración y desmielinización entre

ambos grupos, lo que sugiere el importante papel que desempeñaría la IL-18 en la inducción de la TA-EAE. El modelo pasivo muestra ciertos comportamientos atípicos o diferentes de los del modelo activo que pueden ser inclinación de la cabeza, pelaje “desaliñado”, hipersensibilidad, espasticidad y defectos graves de propiocepción (Stromnes y cols., 2008). Por lo que es posible que la escala de valoración clínica empleada no sea capaz de cuantificar el daño acumulado en los animales y por lo tanto no encontramos diferencias en la escala clínica, aunque si aparecen al realizar el estudio inmunológico en las médulas espinales.

La IL-18 es una potente citoquina proinflamatoria capaz de inducir IFN- $\gamma$ , GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), TNF- $\alpha$  e IL-1 en células inmunocompetentes, para activar la destrucción de los linfocitos y para regular la expresión de ciertos receptores de quimiocinas (Nakanishi y cols., 2001). Okamura y cols ya describieron en 1998 que, aunque la IL-18 no inducía el desarrollo de células Th1, parecía esencial para la inducción y activación efectiva de las células Th1 por la IL-12. Otros autores relacionaron la IL-18 tanto con la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK y Th1, como con la activación de las células NK (Shi F-D y cols., 2000). Además de que IL-18 desempeñaría una función crítica en la regulación de la síntesis de citocinas inflamatorias (Dinarello, C. A., 1999) y en el desarrollo de células Th2 (Nakanishi y cols., 2001). En colaboración con IL-12, la IL-18 producía la activación de células NK (Poznanskiy cols., 2017) y altos niveles de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Ito y cols., 2003). Sin embargo, la sobreproducción de IL-12 e IL-18 induce trastornos inflamatorios graves (Nakanishi y cols., 2001). Estos datos junto con los resultados obtenidos en nuestros experimentos sugieren un efecto potenciador de IL-18 en el desarrollo de nuestro modelo de TA-EAE.

Al estudiar los receptores cannabinoides en las muestras de la zona lumbar de los 3 grupos de estudio (sano, IL-12 e IL-12 + IL-18) se apreció una disminución en el porcentaje de receptores CB<sub>1</sub> y un aumento de los receptores CB<sub>2</sub> y GPR55 en el grupo inoculado con células encefalitógenas activadas con ambas citocinas, mientras que en el grupo con IL-12 solo aumentó significativamente el receptor GPR55 respecto al grupo de animales sanos.

El receptor CB<sub>1</sub> se expresa principalmente en neuronas, aunque también se ha localizado en microglía (Hegyi y cols., 2009; Navarro y cols., 2018). Hay autores que han descrito que tras la inducción de la EAE los niveles de CB<sub>1</sub> disminuían (Berrendero y cols., 2001; Lou y cols., 2012). Según Carlisle y cols., (2012) la activación de microglía y macrófagos reducía la expresión de CB<sub>1</sub> en el SNC. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el grupo en el que se inducía la TA-EAE con la combinación de las dos citocinas, en los que se aprecia daño axonal, desmielinización, una elevada infiltración y activación de la microglía, eventos que podrían estar relacionados con la disminución de este receptor. No se apreciaba esta disminución al adicionar IL-12 sola, en el que encontramos menor infiltración, menor daño axonal y ausencia de desmielinización, sucesos que influirían en que los niveles de CB<sub>1</sub> no estuviesen alterados. Estos datos evidencian que la adición de IL-18 a nuestro modelo provocarían un mayor daño y como consecuencia una disminución en los niveles de CB<sub>1</sub>.

El aumento de CB<sub>2</sub> en el grupo tratado células encefalitógenas activadas con las dos citocinas, podría ser debido a que el ambiente inflamatorio, que incluye la producción de

citocinas inflamatorias como IFN $\gamma$  y GM-CSF promueven la activación microglial y un aumento en la regulación del receptor CB<sub>2</sub> (Maresz y cols., 2005; Sánchez y García-Merino., 2012). En el grupo tratado con IL-12 no se observó cambio en CB<sub>2</sub> en comparación con los animales sanos, lo que podría estar relacionado con la menor infiltración observada en este grupo.

En el grupo tratado únicamente con células tratadas con IL-12 no se observaron variaciones en la expresión de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> si se comparan con el grupo de animales sanos. En otro experimento realizado por nuestro grupo si se apreció una disminución de CB<sub>1</sub> y un aumento de CB<sub>2</sub> (González-García y cols., 2017). Las diferencias encontradas entre este trabajo y el descrito en esta tesis podrían ser debidas al día de sacrificio, 24 y 58 p.i., respectivamente. A día 24 existía mayor infiltración (más CB<sub>2</sub>) y más daño axonal (menos CB<sub>1</sub>) que a día 58 p.i, momento en el que se aprecian menos infiltrados (menos CB<sub>2</sub>) y menos daño axonal (más CB<sub>1</sub>).

El receptor GPR55 se encuentra expresado en en tejido nervioso, vasos sanguíneos y sistema inmunológico (Sisay y cols., 2013) y comparte múltiples ligandos con los receptores clásicos (Lehmann y cols., 2016). Como ya se ha mencionado el CB<sub>2</sub> y GPR55 coexpresan y su regulación podría estar regulada de manera concomitante. Estos datos estarían en línea con los resultados obtenidos, en los que se produce un aumento de expresión de GPR55 en ambos grupos TA-EAE.

Con ello concluimos que la incubación de células encefalitógenas específicas de MOG<sub>35-55</sub> con IL-12 e IL-18 origina una potente actividad encefalitogénica y el modelo desarrollado puede ser una alternativa interesante para el estudio de nuevas terapias y estudios de biodistribución.

### Biodistribución MSC-GFP en el modelo TA-EAE

Para el estudio de distribución se utilizaron células MSC de ratón hembra transfectadas con GFP. Se comprobó que el virus se había integrado en el genoma celular, que no se perdía con las replicaciones celulares y que las MSC infectadas seguían manteniendo sus dos cromosomas X. Este último punto era especialmente importante debido a que inicialmente, la detección diferencial de las células encefalitógenas y las MSC se iba a centrar en la búsqueda los cromosomas sexuales.

Otro punto a verificar fue que mantenían funciones inmunomoduladoras y neuroprotectoras que las caracterizan, ya que hay autores que describen que el efecto neuroprotector de las MSC se debilita después de la infección con lentivirus recombinante (Gu y cols., 2016). Por esta razón, se realizó un estudio *in vitro* con células MSC-GFP para estudiar si la infección con lentivirus GFP modificaba el efecto ejercido sobre las células encefalitógenas descrito anteriormente por las MSC. Se verificó que las MSC-GFP no tenían afectada esta función y, como sucedía con las MSC sin infectar, disminuían la viabilidad de las células encefalitógenas.

El principal inconveniente descrito en la inoculación de las MSC por i.v es la retención de las mismas en el parénquima pulmonar (Eggenhofer y cols., 2012; Meseguer-Olmo y cols., 2017; Leibacher y cols., 2019). Otras hipótesis apuntan a que sería una cuestión mecánica y con la aplicación de un vasodilatador antes de la inoculación de las células

el problema quedaría resuelto (Schrepfer y cols., 2007). En otros estudios realizados en ratones, también se localizaron en el bazo, el hígado, la médula ósea, el intestino y la piel (Li y cols., 2008) pero en mucha menor cantidad. Esto plantea un problema de eficacia del tratamiento debido a que el número de células que llegan al órgano diana, que en nuestro caso era el SNC, es muy reducido. Esto llevó a la selección de una dosis lo suficientemente alta, para que alguna célula “escapase” del pulmón, pero sin sobrepasar un límite que pudiese derivar en complicaciones por obstrucción de capilares pulmonares. En un primer experimento la dosis seleccionada fue  $0.5 \times 10^6$  de MSC dos días por semana y posteriormente se aumentó a 6 inoculaciones, dosis a la cual se comprobó que el tratamiento era más efectivo y no se observaban efectos adversos. Señalar que en experimentos posteriores con 6 inoculaciones se observó un aumento de la mortalidad tras la inoculación.

Para conocer si existía acumulación de MSC-GFP en determinados órganos y si era posible realizar un seguimiento a largo plazo de la biodistribución de las MSC-GFP inyectadas, o por el contrario la señal desaparecía, se realizó un experimento en animales sanos en distintas condiciones de días de inoculación y sacrificio. Se comprobó que las MSC se dirigían a pulmón y bazo donde se localizaron a día 3 y 10 p.i, mientras que a día 16 habían desaparecido de ambas ubicaciones. La llegada de las MSC a los órganos diana es cuestión de segundos o minutos después de la inoculación i.v, pero modelos murinos en los que se ha usado bioluminiscencia, muestran una disminución muy rápida de la señal de estas células, desapareciendo del todo a los 7 días post-inoculación (Tögel y cols., 2008). Esto explicaría la razón de que a día 16 no hubiese señal en ninguna localización, ya que habrían transcurrido 7 días desde la última inoculación. Como era de esperar no se encontraron células en el SNC, resultado que concuerda con otros estudios de biodistribución realizados en EAE (Bai y cols., 2009).

Posteriormente se analizó la biodistribución en animales hembra TA-EAE en los que se habían inoculado células encefalíticas de macho. El tratamiento consistió en 4 inoculaciones i.v de 0.5 millones de MSC-GFP a día 0, 2, 7 y 9 y los animales fueron sacrificados a día 16 p.i. Se encontraron MSC-GFP en la médula lumbar, lo que hace suponer que las MSC atraviesan la BHE y llegan a zonas de inflamación. No se detectaron en ninguna otra localización. Este hallazgo concuerda con lo especificado por otros autores, que detectaron MSC en el SNC dentro de las 24 h p.i y hasta 45 días después, aunque en menor número. Además, observaron células en zonas de desmielinización de la médula espinal (Bai y cols., 2009). Otros estudios, por el contrario, no encontraron evidencias de la migración de MSC y explican que la eficacia terapéutica de las células podría relacionarse con efectos sistémicos (Abramowski y cols., 2016).

Este hallazgo evidencia que las MSC se dirigen a zonas inflamadas de la médula espinal interfiriendo en el curso de la TA-EAE, como estaba descrito en el modelo EAE, donde las MSC inhiben la respuesta de células T desencadenada en los órganos linfoides secundarios (Zappia y cols., 2005).



## Biodistribución de células encefalitógenas en el modelo TA-EAE

Para analizar la biodistribución de células encefalitógenas en el modelo TA-EAE, se inocularon células activadas procedentes de ratones macho C57BL/6 EAE, en hembras de la misma cepa y, se estudió su biodistribución a través de detección del cromosoma Y. Se realizó un estudio por qPCR de muestras de tejidos (bazo, riñón, pulmón, corazón cerebro y médula) procedentes de hembras sacrificadas a día 16 p.i y no se detectó señal en ninguno de las muestras analizadas. Este resultado no concuerda con los de otros investigadores, los cuales localizan células T de día 12 a día 16 p.i en la médula espinal mayoritariamente, aunque también las observan en tejidos cerebrales (Clarkson y cols., 2014). La discrepancia con nuestros resultados podría ser explicada en parte a diferencias en las técnicas de detección.

Estudios realizados en rata Lewis, muestran que las células encefalitógenas atraviesan la BHE a días 1, 2 y 3 p.i (Bartholomäus y cols., 2009), por lo que otra posible explicación de los resultados obtenidos sería que las células encefalitógenas inoculadas hubiesen atravesado la BHE en los primeros días tras la inoculación y, una vez en el SNC hubiesen reactivado y desencadenado el paso de más linfocitos procedentes del animal receptor. Este paso posterior de células activadas procedentes del animal receptor contribuyó en la inflamación y daño causado en la enfermedad, que dio lugar a los signos clínicos característicos de TA-EAE. Las células inoculadas XY habrían desaparecido a día 16 p.i, lo que estaría en la línea de los resultados obtenidos en nuestro experimento.

Entre las opciones para efectuar un rastreo de las células encefalitógenas durante un periodo amplio de días se consideró el uso de NP por su gran sensibilidad, como se ha demostrado en estudios de rastreo celular tras transplante de MSC en modelos animales de daño medular hemorrágico (Xu y cols., 2011), por lo que se procedió a marcar las células encefalitógenas con NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$ .

Una ventaja de estas NP es que tienen un doble marcaje, lo que permitió corroborar su detección mediante la aplicación de diferentes técnicas. Al emitir en el canal IR820nm pudieron ser estudiadas mediante microscopía confocal y, además, al estar cargadas con  $\text{Fe}^{2+}$  podían detectarse por resonancia magnética en T2 y por reflexión en el microscopio confocal. Con este doble marcaje se solventó el problema de obtención de falsos positivos descrito en la bibliografía derivado de que las NP que contienen óxido de hierro se retienen en los tejidos, incluso si la célula inoculada muere (Sohni y Verfaillie., 2013).

En primer lugar, se comprobó mediante citometría de flujo y microscopía confocal que las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  eran capaces de internalizarse en las células encefalitógenas. El estudio realizado a distintas concentraciones y tiempos mostró que, como se esperaba, las células marcadas emitían en IR y se visualizaban mediante reflexión. Además, se observó que a mayor concentración de NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$ , mayor era la señal obtenida por ambas técnicas y que la misma aumentaba proporcionalmente con el tiempo de cultivo. Otro factor que se consideró fue que las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  tuviesen una toxicidad mínima en las células encefalitógenas (Park., 2016). Mediante citometría de flujo y el ensayo de alamar blue se observó que las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  no influían en la viabilidad celular, por lo que se seleccionó la condición T4 para el resto de experimentos,

que era la que tenía una concentración mayor de  $\text{Fe}^{2+}$  (1/10) y mayor concentración de NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  (1/50).

Las células encefalitógenas marcadas con NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  se infundieron por vía i.p a animales. A dos de ellos se les realizó RM antes e inmediatamente después de la inoculación y a las 24 y 48 h, encontrándose señal en T2 únicamente en la cavidad peritoneal justo tras la inoculación celular. De estos resultados se dedujo que la técnica no era lo suficientemente sensible como para detectar la señal, y una posible explicación fue que las células marcadas se encontrasen por debajo del umbral de detección, como ya indicaban otros autores (Bulte., 2019). Esta teoría se vió apoyada por el hecho de que, en esos mismos tiempos se realizó un estudio *ex vivo* de los otros dos animales que habían sido inoculados en paralelo, y en ellos sí se detectaron por microscopía confocal células en cerebro, médula espinal, ganglios y bazo a día 1 y día 2 p.i. No se encontraron células marcadas en el resto de localizaciones estudiadas (hígado, pulmones, corazón, riñones y sangre). Estos hallazgos concuerdan con estudios anteriores, los cuales habían sugerido el plexo coroideo como una puerta de entrada al SNC (Schmitt y cols., 2012; Meeker y cols., 2012) y otros autores han descrito acumulación periventricular de linfocitos T específicos de mielina durante el inicio de la EAE, antes de su aparición en la médula espinal (Clarkson y cols., 2014).

Al no poder realizar un seguimiento *in vivo* de la distribución de las células encefalitógenas marcadas mediante RM, se procedió a diseñar un experimento para estudiar la biodistribución *ex vivo*. Los animales inoculados con células marcadas y sacrificados a día 1, 2 y 3 p.i volvieron a mostrar que había células encefalitógenas en bazo, ganglio, médula y cerebro. A día 4 p.i continuaba la señal en bazo, pero en el resto de los órganos la señal se había perdido y a día 7 p.i la señal de las células había desaparecido. Investigaciones de otros grupos muestran que la mayoría de las células marcadas con NP que son inoculadas mueren al poco tiempo y las NP liberadas serían fagocitadas y eliminadas a través del sistema retículo endotelial, acumulándose en hígado y bazo (Lee y cols; 2009; Kidd y cols., 2009). Hay estudios que sugieren que las NP marcadas con  $\text{Fe}^{2+}$  pueden inducir principalmente toxicidad en el hígado y el sistema inmunológico (Park., 2016). Estos estudios concuerdan con nuestros resultados obtenidos en los animales sanos, a los que solo se les inoculó NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$ , las cuales fueron detectadas en bazo a día 1 y día 2 p.i, desapareciendo a partir de ese momento. En el grupo de animales control, a los que se les inoculó células encefalitógenas sin marcar, no se detectó señal en ninguno de los órganos y en ninguno de los días de estudio.

Para comprobar que las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  estaban internalizadas y la señal que se detectaba en los tejidos procedía de células encefalitógenas marcadas, se procedió a teñir los núcleos celulares y comprobar la colocalización por microscopía confocal.

Para asegurar que las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  no influían en la capacidad encefalitógena de las células una vez inoculadas se inoculó en paralelo otro grupo de animales con células encefalitógenas marcadas con NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  (n=5) y otro con células encefalitógenas sin marcar (n=5). Se valoraron los signos clínicos de ambos grupos durante 24 días y los resultados mostraron que no había diferencias significativas en el desarrollo de la TA-EAE entre ambos grupos, lo cual evidencia que las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  no alteran la capacidad encefalitógena de nuestras células.

Esta técnica permitió la monitorización celular, detectándose señal en cerebro, médula espinal, ganglios y bazo, lo que evidenció que estas células atraviesan la BHE cuando son inoculadas i.p., y se eliminan en el bazo. Cuando únicamente se inocularon las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$ , se localizan en el bazo, donde son eliminadas, sin causar aparentemente toxicidad en el animal.

Por todas estas evidencias, podemos afirmar que las NP IR-820 nm  $\text{Fe}^{2+}$  son una buena herramienta para la localización de nuestras células en el modelo TA-EAE, no afectando a la viabilidad ni a su capacidad encefalitógena.



## CONCLUSIONES

- El tratamiento con CBD mejora los signos clínicos en el modelo de EAE de transferencia pasiva. Esta mejoría concuerda con una marcada disminución en el SNC de las células T, macrófagos y microglía, acompañada de una reducción en el daño axonal, en la desmielinización y una mejoría en la resonancia magnética.
- El tratamiento con MSC disminuye los signos clínicos de la EAE de transferencia pasiva acompañado con la disminución del número de linfocitos T, macrófagos y astrocitos. El estudio histológico demuestra una reducción en el daño axonal y una mejoría en la resonancia magnética.
- Comparativamente el tratamiento con CBD reduce la escala clínica en el modelo de EAE de transferencia pasiva en mayor grado que el tratamiento con células madre mesenquimales de médula ósea.
- El uso concomitante de CBD y MSC, refleja como CBD potencia el efecto terapéutico de las MSC en el modelo de EAE de transferencia pasiva.
- La combinación de IL-12 e IL-18 produce un aumento de la activación de las células encefalitogénicas *in vitro*, induciendo un aumento de IFN- $\gamma$ . Este incremento se traduce en una mayor infiltración, daño axonal, desmielinización y gravedad en la clínica de EAE de transferencia pasiva. Así mismo se correlacionó con disminución del receptor CB<sub>1</sub> y aumento de los receptores CB<sub>2</sub> y GPR55.
- Los estudios de biodistribución demuestran como las células encefalitógenas atraviesan la barrera hematoencefálica en las primeras horas tras la inoculación, localizándose principalmente en el sistema nervioso central.
- Las nanopartículas pueden ser un buen instrumento para diferentes estudios en el modelo de EAE de transferencia pasiva debido a su buena tolerabilidad y su baja toxicidad.
- El patrón circulatorio de las MSC observado tras su inoculación evidencia el paso de estas células al SNC de animales EAE de transferencia pasiva, donde podrían ejercer sus propiedades antiinflamatorias y regeneradoras en las zonas de inflamación y daño tisular.

**A**bramowski, P., Krasemann, S., Ernst, T., Lange, C., Ittrich, H., Schweizer, M., Zander, A.R., Martin, R., Fehse, B. *Mesenchymal Stromal/Stem Cells Do Not Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Are Not Detectable in the Central Nervous System of Transplanted Mice*. *Stem Cells Dev.* 2016;25(15):1134-48.

**A**dams, R., Baker, B.R., Wearn, R.B. *Structure of cannabinol III. Synthesis of cannabinol, 1-hydroxy-3-n-amy-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran*. *J. Am. Chem Soc.* 1940a; 62:2204-2207.

**A**guado, T., Romero, E., Monory, K., Palazuelos, J., Sendtner, M., Marsicano, G., Lutz, B., Guzmán, M., Galve-Roperh, I. *The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis*. *J Biol Chem* 2007; 282(33):23892-8.

**A**nderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., Sofroniew, M.V. *Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration*. *Nature*. 2016; 532(7598):195-200.

**A**rdeshty Lajimi, A., Hagh, M.F., Saki, N., Mortaz, E., Soleimani, M., Rahim, F. *Feasibility of cell therapy in multiple sclerosis: A systematic review of 83 studies*. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 2014; 7:15–33.

**A**revalo-Martin, A., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Borrell, J., Guaza, C. *Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis*. *J Neurosci* 2003; 23: 2511–2516.

**A**rnold, D.L., De Stefano, N. *Preventing brain atrophy should be the gold standard of effective therapy in multiple sclerosis (after the first year of treatment): Commentary*. *Mult Scler* 2013; 19:1007–8.

**A**thie-Morales, V., Smits, H.H., Cantrell, D.A., Hilken, C.M. *Sustained IL-12 signaling is required for TH1 development*. *J. Immunol.* 2004;172, 61–69.

**B**ai, L., Caplan, A.I., Lennon D., Miller, R.H. *Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate* *Neurochem Res.* 2007; 32:353-362.

**B**ai, L., Lennon, D.P., Caplan, A.I., DeChant, A., Hecker J., Kranso J., Zaremba A., Miller R.H. *Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models*. *Nat. Neurosci.* 2012; 15:862–870.

- Bai, L., Lennon, D.P., Eaton, V, Maier, K., Caplan, A.I., Miller, S.D., Miller, R.H.** Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009 ;57(11):1192–1203.
- Baker, D., Pryce, G.** *The endocannabinoid system and multiple sclerosis*. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(23):2326-36.
- Barati, S., Ragerdi Kashani, I., Moradi, F., Fatemeh, T., Soraya, M.b Mahmood, B., Mohammad Taghi, J.** Mesenchymal stem cell mediated effects on microglial phenotype in cuprizone-induced demyelination model. *J Cell Biochem*. 2019; 1- 13.
- Barreiro, O., Sánchez-Madrid, F.** Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(5):552-62.
- Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schlager, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E., Flugel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., Flugel, A.** Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*. 2009; 462:94–98.
- Batoulis, H., Addicks, K., Kuerten, S.** Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/TH1 paradigm. *Ann. Anat*. 2010;192(4): 179–193.
- Baustian, C., Hanley, S., Ceredig, R.** Isolation, selection and culture methods to enhance clonogenicity of mouse bone marrow derived mesenchymal stromal cell precursors. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:151.
- Baxter, A.G.** *The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:904–12.
- Begum-Haque, S., Sharma, A., Kasper, I.R., Foureau, D.M., Mielcarz, D.W., Haque, A., Kasper, L.H.** Downregulation of IL-17 and IL-6 in the central nervous system by glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2008;204(1-2):58-65.
- Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., Ioannidis, JPA., Tzoulaki, I.** Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015;14(3):263-273.
- Benito, C., Tolón, R. M., Pazos, M. R., Nuñez, E., Castillo, A.I., Romero J.** Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* 2008. 153(2): 277-285.
- Benkhoucha, M., Santiago-Raber, M.L., Schneiter, G., Chofflon, M., Funakoshi, H., Nakamura, T., Lalive, P.H.** Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107:6424–6429.
- Berrendero, F., Sánchez, A., Cabranes, A., Puerta, C. Ramos, J.A, García-Merino, A., Fernández-Ruíz, J.** Changes in cannabinoid CB (1) receptors in striatal and cortical regions

of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse* 2001; 41(3):195-202.

**Bih, C.I., Chen, T., Nunn, A.V., Bazetot, M., Dallas, M., Whalley, B.J.** *Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders.* *Neurotherapeutics.* 2015; 12:699–730.

**Bittner, S., Afzali, A.M., Wiendl, H., Meuth, S.G.** *Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice.* *J Vis Exp.* 2014; (86).

**Bove, R., Healy, B.C., Musallam, A., Glanz, B.I., De Jager, P.L., Chitnis, T.** *Exploration of changes in disability after menopause in a longitudinal multiple sclerosis cohort.* *Mult Scler.* 2015; 22(7):935-43.

**Brambilla, R.** *The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.* *Acta Neuropathol.* 2019;137(5):757-783.

**Brosnan, C.F, Raine, CS.** Mechanism of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 1996; 6:243-257.

**Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., et al.** *Atlas of multiple sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity.* *Neurology.* 2014; 83(11):1022-1024.

**Brownlee, W.J., Hardy, T.A., Fazekas, F., Miller, D.H.** *Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges.* *Lancet.* 2017; 389:1336-46.

**Bulte, J.W.** *In vivo MRI cell tracking: clinical studies.* *AJR Am J Roentgenol.* 2009; 193:314–25.

**Burstein, S.** *Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation.* *Bioorg Med Chem* 2015; 23(7):1377-85.

**Cabranes, A., Venderova, K., de Lago, E., Fezza F., Sánchez, A.J., Mestre, L., Valenti, M., García-Merino, A., Ramos, J.A., Di Marzo, V., Fernández-Ruiz, J.** *Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis.* *Neurobiol Dis.* 2005; 20(2): 207-17.

**Caplan, A.I.** *Mesenchymal stem cells.* *J. Orthop. Res.* 1991; 9:641–650.

**Caplan, A.I., Correa, D.** *The MSC: an injury drugstore.* *Cell Stem Cell.* 2011;9(1):11–5.

**Carlisle, S.J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., Cabral, G.A.** *Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation.* *Int Immunopharmacol.* 2002; 2:69–82.

**Ceronie B, Jacobs, B.M, Baker, D, et al.** *Cladribine treatment of multiple sclerosis is associated with depletion of memory B cells.* *J Neurol.* 2018; 265(5):1199-1209.

**Charcot J.M.** Histologie de la sclerose en plaque. *Gazette Hospital (Paris)* 1868; 41:554-566.

**Chen, M.L., Yan, B.S., Kozoriz, D., Weiner, H.L.** *Novel CD8(+) regulatory T cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms.* *Eur J Immunol.* 2009; 39:3423–35.

**Chiurchiù, V., Lanuti, M., De Bardi M., Battistini L., Maccarrone M.** *The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells.* *Int Immunol.* 2015; 27:153–160.

**Clarkson, B. D., Walker, A., Harris, M., Rayasam, A., Sandor, M., Fabry, Z.** Mapping the accumulation of co-infiltrating CNS dendritic cells and encephalitogenic T cells during EAE. *Journal of neuroimmunology.* 2014; 277(1-2), 39–49.

**Cohen, J.A., Chun, J.** Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2011; 69(5):759-77.

**Cohen, J.A., Rae-Grant A.** *Handbook of Multiple Sclerosis.* Springer Healthcare, London, 2012. (BOOK)

**Cogle, C.R., Yachnis, A.T., Laywell, E.D., Zander, D.S., Wingard, J.R., Steindler, D.A., Scott, E.W.** *Bone Marrow Transdifferentiation in Brain after Transplantation: A Retrospective Study.* *Lancet (London, England)* 363, no. 9419 (2004): 1432–37.

**Coles, A.J., Compston, D.A., Selmaj, K.W., Lake, S.L., Moran, S., Margolin, D.H., Norris, K., Tandon, P.K.** *Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis.* *N. Engl. J. Med.* 2008; 359:1786–1801.

**Confavreux, C., Vukusic, S.** The clinical course of multiple sclerosis. In: Goodin DS, ed. *Handbook of Clinical Neurology: Multiple Sclerosis and Related Disorders.* 3rd series. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier B.V.; 2014:343-369.

**Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D.J., Patani, R., Michell, A.W., Du, M.Q., Luan, S.L., Altmann, D.R., Thompson, A.J., et al.** *Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: An open-label phase 2a proof-of-concept study.* *Lancet Neurol.* 2012; 11:150–156.

**Cree, B.A.C., Mares, J., Hartung, H.P.** *Current therapeutic landscape in multiple sclerosis: an evolving treatment paradigm.* *Curr Opin Neurol.* 2019;32(3):365-377.

**Dalakas, M.C.** *B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders.* *Nature clinical practice Neurology.* 2008; 4(10):557–67.

**De Miguel, M.P., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Pascual, C.Y., Aller, M.A., Arias, J., Arnalich-Montiel, F.** *Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: Advances and applications.* *Curr. Mol. Med.* 2012; 12:574–591.

**De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini, P.C., Orlando, P., Di Marzo, V.** *Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8.* J Pharmacol Exp Ther; 2008; 325(3):1007-15.

**Deangelis, T.M., Miller, A.** Diagnosis of multiple sclerosis. Handb Clin Neurol. 2014; 122:317-42.

**Devane, W.A., Dysarz, F.A. 3rd., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C.** Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol; 1988; 34(5):605-13.

**Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R.** Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science; 1992 258(5090):1946-9.

**Devinsky, O, Cilio M.R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W.G., Martinez-Orgado, J., Robson, P.J., Rohrback, B.G., Thiele, E., Whalley, B., Friedman, D.** *Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders.* Epilepsia; 2014; 55(6):791-802.

**Di Marzo, V., Stella, N., Zimmer, A.** *Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain.* Nat Rev Neurosci. 2015; 16(1): 30-42.

**Di Marzo, V., Piscitelli, F.** *The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids.* Neurotherapeutics. 2015; 12(4): 692-698.

**Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L.** *The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation.* Nat. Rev. Drug Discov. 2004. 3 771–784. 10.1038 / nrd1495

**Dinarello, C.A.** *IL-18: a Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family.* J. Allergy. Clin. Immunol. 1999; 103:11.

**Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Staper Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al.** *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.* The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8:315-17.

**Dulamea A.** *Mesenchymal stem cells in multiple sclerosis - translation to clinical trials.* J Med Life. 2015 ;8(1):24–27.

**Duquette, P., Pleines, J., Girard, M., Charest, L., Senecal-Quevillon, M., Masse, C.** *The increased susceptibility of women to multiple sclerosis.* Can J Neurol Sci. 1992; 19:466-471.

**Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A.** *Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion.* Front Immunol. 2012; 3:297.

**E**instein, E.R., Robertson, D.M., Dicaprio, J.M., Moore, W. *The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity*. J. Neurochem. 1962; 9:353-361.

**E**lSohly, M. A., Slade, D. *Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids*. Life Sciences 78, no. 5. 2005; 539–48.

**E**ngelhardt, B., Coisne, C. *Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle*. Fluids Barriers CNS; 2011; 8(1):4.

**E**rta, M., Quintana, A., Hidalgo, J. *Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system*. Int J Biol Sci. 2012;8(9):1254–1266.

**F**eliú, A., Moreno-Martet, M., Mecha, M., Carrillo-Salinas, F.J., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J., Guaza, C. *A Sativex®-like combination of phytocannabinoids as a disease-modifying therapy in a viral model of multiple sclerosis*. Br. J. Pharmacol. 2015; 172 (14) 3579 – 3595.

**F**ernández-Fernández, A., Manchanda, R., Carvajal, D., Lei, T., Srinivasan, S., McGoron, A., *Covalent IR820-PEG-diamine nanoconjugates for theranostic applications in cancer*, International Journal of Nanomedicine. 2014; 4631.

**F**ernández-Ruiz, J., Romero, J., Ramos, J.A. *Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others*. Handb Exp Pharmacol. 2015b; 231:233–59.

**F**ezza, F., Bari, M., Florio, R., Talamonti, E. y cols. *Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes*. Molecules. 2014, 24; 19(11):17078-17106.

**F**reund, J. *The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review*. Am. J. Clin. Pathol. 1951; 21:645-656.

**F**reedman, M.S., Bar-Or, A., Atkins, H.L., Karussis, D., Frassoni, F., Lazarus, H., Scolding, N., Slavin, S., Le Blanc, K., Uccelli A. *The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: Consensus report of the International MSCT Study Group*. Mult. Scler. 2010; 16:503–510.

**F**riedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K, Lalykina, K.S. *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet. 1970, 3: 393-403.

**F**riese, M.A, Fugger, L. *Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis*. Ann Neurol. 2009; 66:132–41.

**G**aliegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P. *Expression of central and peripheral*



*cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations.* Eur J Biochem. 1995; 232: 54–61.

**G**alve-Roperh, I., Chiurchiù, V., Díaz-Alonso, J., Bari, M., Guzmán, M., Maccarrone, M. *Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation.* Prog Lipid Res. 2013;52(4):633-50.

**G**arcía, M. C., Cinquina V., Palomo-Garo, C., Rabano, A., Fernández-Ruiz, J. *Identification of CB (2) receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease.* Neurosci Lett. 2015; 587: 1-4.

**G**arcía-Merino, A., Fernández, O., Montalbán, X., de Andrés, C., Oreja-Guevara, C., Rodríguez-Antigüedad, A., Arbizu, T., Grupo de Consenso de la Sociedad Española de Neurología. *Consensus Statement on Medication Use in Multiple Sclerosis by the Spanish Society of Neurology's Study Group for Demyelinating Diseases.* Neurología (Barcelona, Spain) 2013;28: 375–78.

**G**ao, F., Chiu, S.M., Motan, D.A.L, Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.L., Tse, H.F., Fu, Q.L., Lian, Q. *Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects.* Cell Death & Disease. 2016; 7: e2062.

**G**erard, C.M., Mollereau, C., Vassar, t G., Parmentier M. *Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis.* Biochem J. 1991; 279:129-134.

**G**erdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R., Uccelli, A. *Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Ann Neurol. 2007; 61(3):219–27.

**G**iacoppo, S., Soundara Rajan, T., Galuppo, M., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., Mazzon, E. *Purified Cannabidiol, the main non-psychoactive component of Cannabis sativa, alone, counteracts neuronal apoptosis in experimental multiple sclerosis.* Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015; 19 (24): 4906-4919.

**G**ijbels, K., Brocke, S., Abrams, J.S., Steinman, L. *Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation.* Mol Med. 1995; 1:795–805

**G**oldmann, T., Wieghofer, P., Muller, P.F, Wolf, Y., Varol, D., Yona, S., Brendecke, S.M., Kierdorf, K., Staszewski, O., Datta, M., Luedde, T., Heikenwalder, M., Jung, S., Prinz, M. *Un nuevo tipo de gen de microglia la orientación muestra que TAK1 es fundamental en la inflamación autoinmune del SNC.* Nat Neurosci. 2013; 16: 618-1626.

**G**ómez-Gálvez, Y., Palomo-Garo, C., Fernández-Ruiz, J., García, C. *Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2016; 64:200-208.

**González-García, C., Torres, I.M., García-Hernández, R., Campos-Ruiz, L., Esparragoza, L.R., Coronado, M.J., Grande, A.G., García-Merino, A., Sánchez A.J.** *Mechanisms of action of cannabidiol in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis.* Exp Neurol. 2017;298(Pt A):57-67.

**Goodman, A.D., Brown, T.R., Krupp, L.B., Schapiro, R.T., Schwid, S.R., Cohen, R., Marinucci, L.N., Blight, A.R.** *Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomised, double-blind, controlled trial.* Lancet. 2009; 28; 373(9665):732-8.

**Greenwood, J., Hammarlund-Udenaes, M., Jones, H.C., et al.** *Current research into brain barriers and the delivery of therapeutics for neurological diseases: a report on CNS barrier congress London, UK, 2017.* Fluids Barriers CNS. 2017; 14(1):31.

**Gu, Y., He, M., Zhou, X., Liu, J., Hou, N., Bin, T., Zhang, Y., Li, T., Chen, J.** *Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by supressing apoptosis in astrocyte.* Sci Rep. 2016; 6:18587.

**Hammell, D.C., Zhang, L.P., Ma, F., Abshire, S.M., McIlwrath, S.L., Stinchcomb, A.L., Westlund, K.N., 2015.** *Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis.* Eur J Pain. doi:10.1002/ejp.818

**Hart, F.M., Bainbridge, J.** *Current and emerging treatment of multiple sclerosis.* Am J Manag Care. 2016 Jun; 22(6 Suppl): s159-70.

**Hegyi, Z., Kis, G., Holló, K., Ledent, C., Antal, M.** *Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord.* Eur J Neurosci. 2009 Jul;30(2):251-62.

**Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa B. R., Rice, K. C.** *Cannabinoid receptor localization in brain.* 1990. Proc Natl Acad Sci USA 87(5): 1932-1936.

**Hickey, W.F.** *Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles.* Semin Immunol. 1999; 11(2):125-37.

**Hilla, A.M., Diekmann, H., Fischer, D.** *Microglia Are Irrelevant for Neuronal Degeneration and Axon Regeneration after Acute Injury.* J Neurosci. 2017;21;37(25):6113-6124.

**Hiroya, K., Kazutaka, N., Takanori, Y.** *Blood–brain barrier: A novel therapeutic target in multiple sclerosis.* Clinical and Experimental Neuroimmunology. 2015; 6:129–138.

**Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., Pertwee, R. G.** *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors.* 2002. Pharmacol Rev 54(2): 161-202.

**Hu, G., Ren, G., Shi, Y.** *The putative cannabinoid receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation.* Oncogene. 2011; 30(2):139-41.

**Hu, Y., Lou, B., Wu, X., Wu, R., Wang, H., Gao, L., Pi, J., Xu, Y.** *Comparative Study on In Vitro Culture of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. Stem Cells International, vol. 2018, Article ID 6704583, 14 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6704583>.

**Hucke, S., Wiendl, H., Klotz L.** *Implications of dietary salt intake for multiple sclerosis pathogenesis*. Mult Scler. 2016; 22:133-9.

**Huffman, J.W.** *The search for selective ligands for the CB2 receptor*. 2000. Curr.Pharm Des. 6 (13):1323-37

**Idris, A.I.** *The promise and dilemma of cannabinoid therapy: lessons from animal studies of bone disease*. Bonekey Rep. 2012; 1:224.

**Inglese, M., Bester, M.** *Diffusion imaging in multiple sclerosis: research and clinical implications*. NMR Biomed. 2011; 23:865–872.

**Ito, A., Matejuk, A., Hopke, C., Drought, H., Dwyer, J., Zamora, A., Subramanian, S., Vandembark, A.A., Offner, H.** *Transfer of severe experimental autoimmune encephalomyelitis by IL-12- and IL-18-potentiated T cells is estrogen sensitive*. J Immunol. 2003; 170(9):4802-9.

**Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., Littman, D.R.,** *The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells*. Cell. 2006; 126:1121–1133.

**Jadidi-Niaragh, F, Mirshafiey, A.** *Therapeutic Approach to Multiple Sclerosis by Novel Oral Drug*. Recnt Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery. 2011; 5(1):66–80.

**Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, Makriyannis A, Avraham S, Avraham HK.** *Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells*. PLoS ONE 2007; 2(7): e641.

**Juhler, M., Barry, D.I., Offner, H., Konat, G., Klinken, L., Paulson, O.B.** *Blood-brain and blood-spinal cord barrier permeability during the course of experimental allergic encephalomyelitis in the rat*. Brain Res. 1984; 302(2):347-355.

**Kalant, H.** *Medical use of cannabis: history and current status*. Pain Res Manage, 2011. 6(2): 80–91.

**Kamali, A., Oryan, A., Hosseini, S., Ghanian, M.H., Alizadeh, M., Baghaban Eslaminejad, M., Baharvand, H.** *Cannabidiol-loaded microspheres incorporated into osteoconductive scaffold enhance mesenchymal stem cell recruitment and regeneration of critical-sized bone defects*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019; 101:64-75.

**Karussis D.** *The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review*. J Autoimmun. 2014; 48–9:134–42.

**Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J.M, Kassis, I., Bulte, J.W., Petrou, P., Ben-Hur, T., Abramsky, O., Slavin, S.** *Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis.* Arch Neurol. 2010; 67(10): 1187-94.

**Kassubek, R., Gorges, M., Schocke, M., Hagenston, V.A.M., Huss, A., Ludolph, A.C., Kassubek, J., Tumani, H.** *GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation.* Neurosci Lett. 2017; 657:166-170.

**Katona, I., Freund, T.F.** *Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain.* Annu Rev Neurosci. 2012; 35:529-58.

**Katona, S., Kaminski, E., Sanders, H. & Zajicek, J.** *Cannabinoid influence on cytokine profile in multiple sclerosis.* Clin. Exp. Immunol. 2005; 140:580-585.

**Kamali, A., Oryan, A., Hosseini, S., Ghanian, M.H. Alizadeh, M., Baghaban Eslaminejad, M. Baharvand, H.** *Cannabidiol-loaded microspheres incorporated into osteoconductive scaffold enhance mesenchymal stem cell recruitment and regeneration of critical-sized bone defects.* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019; 101:64-75.

**Keating, A.** *Mesenchymal Stromal Cells: New Directions.* Cell Stem Cell. 2012;10(6): 709–16.

**Keating, G.M.** *Delta-9-Tetrahydrocannabinol/Cannabidiol Oromucosal Spray (Sativex®): A Review in Multiple Sclerosis-Related Spasticity.* Drugs. 2017; 77(5):563-574.

**Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M., Andreeff, M., Marini, F.C.** *Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging.* Stem Cells. 2009; 27:2614–23.

**Klein, T.W.** *Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics.* Nat Rev Immunol. 2005; 5, 400–411.

**Kleinewietfeld, K., Manzel, A., Titze, J., Kvakan, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D., Hafler, D.** *Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells.* Nature 2013; 496:518-22.

**Koch-Henriksen, N., Bove, P.S.** *The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology.* Lancet Neurol. 2010; 9(5):520-532.

**Kolf, C.M., Cho, E., Tuan, R.S.** *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.* Arthritis Res Ther. 2007; 9(1):204.

**Köse, S., Aerts-Kaya, F., Köprü, Ç.Z., Nemutlu, E., Kuşkonmaz, B., Karaosmanoğlu, B., Taşkıran, E.Z., Altun, B., Uçkan Çetinkaya, D., Korkusuz, P.** *Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic*

*stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation.* Exp Hematol. 2018; 57:30-4. e1.

**Kozela, E., Juknat, A., Gao, F., Kaushansky, N., Coppola, G., Vogel, Z.** *Pathways and gene networks mediating the regulatory effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, in autoimmune T cells.* J Neuroinflammation. 2016;13(1):136.

**Kozela, E., Lev, N., Kaushansky, N., Eilam, R., Rimmerman, N., Levy, R., Ben-Nun, A., Juknat, A., Vogel, Z.** *Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice.* Br J Pharmacol 2011; 163: 1507-1519.

**Krampera M., Cosmi L., Angeli R., Pasini A., Liotta F., Andreini A., Santarlasci V., Mazzinghi B., Pizzolo G., Vinante F., et al.** *Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells.* Stem Cells. 2006; 24:386–398.

**Kurkowska-Jastrzebska, I., Świątkiewicz, M., Zaremba, M., Cudna, A., Piechal, A., Pyrzanowska, J., Widy-Tyszkiewicz, E., Członkowska, A.** *Neurodegeneration and inflammation in hippocampus in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in rats by one - Time administration of encephalitogenic T cells.* Neuroscience.2013; 248:690–698.

**Kyran, E.L., Robinson, C., Kocovski, P., Li, Z., Dang, P.T., Hale, M.W., Orian, J.M.** *Multiple pathological mechanisms contribute to hippocampal damage in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis.* Neuroreport. 2018; 29(1):19-24.

**Lanciego, J. L., Barroso-Chinea, P., Rico, A. J., Conte-Perales, L., Callen, L., Roda, E., Gómez- Bautista, V., López, I. P., Lluís, C., Labandeira-García, J. L., Franco, R.** *Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of Macaca fascicularis.* J Psychopharmacol. 2011; 25(1): 97-104.

**Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.Y., Lu, H.C., Hille, B., Mackie, K.** *GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(7):2699-704.

**Lee, J.W., Fang, X., Krasnodembskaya, A., Howard, J.P., Matthay, M.A.** *Concise review: mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors.* Stem Cells. 2011; 29(6): 913-919.

**Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., Kota, D.J., Ylostalo, J., Larson, B.L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., Prockop, D.J.** *Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6.* Cell Stem Cell. 2009; 5:54–63.

Lee Y.K., Menezes J.S., Umesaki Y., Mazmanian S.K. *Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 108:4615-22.

Lehmann, C., Yang, H., Zhou, J. *GPR55 – a putative ‘type 3’ cannabinoid receptor in inflammation*. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2016; 27:297–302.

Leibacher, J., Dauber, K., Ehser, S., Brixner, V., Kollar, K., Vogel, A., Spohn, G., Schäfer, R., Seifried, E., Henschler, R. *Human mesenchymal stromal cells undergo apoptosis and fragmentation after intravenous application in immune-competent mice*. Cytotherapy. 2017; 19(1):61-74.

Li D., Chai J., Shen C., Han Y., Sun T. *Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells using a novel co-culture technique*. Cytotechnology. 2014; 66:699–708.

Li, H., Guo, Z.K., Li, X.S., Hou, C.M., Tang, P.H., Mao, N. *Functional and phenotypic alteration of intrasplenic lymphocytes affected by mesenchymal stem cells in a murine allosplenocyte transfusion model*. Cell Transplant. 2007; 16:85–95.

Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Shi, S. *Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$* . Nature medicine. 2011; 17(12):1594–1601.

Liu X., Ren S., Qu X., Ge C., Cheng K., Zhao R.C. *Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN- $\gamma$ -mediated SOCS3 activation*. Immunol. Res. 2015; 61:219–229.

Li, X., Shang, B., Li, Y.N., Shi, Y., Shao, C. *IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide*. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):18.

Li Z, Liu F, He X, Yang X, Shan F, Feng J. *Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate inflammation and demyelination of the central nervous system in EAE rats by regulating the polarization of microglia*. Int Immunopharmacol. 2019; 67:268-280.

Llufriu S., Sepulveda M., Blanco Y., Marin P., Moreno B., Berenguer J., Gabilondo I., Martinez-Heras E., Sola-Valls N., Arnaiz J.A., et al. *Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis*. PLoS ONE. 2014; 9: e113936.

Lou, Z.-Y., Zhao, C.-B., Xiao, B.-G. *Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by the selective CB1 receptor antagonist*. J Neurosci Res. 2012; 90: 84–95.

Lucas R.M., Ponsonby A.L., Dear K., Valery P.C., Pender M.P., Taylor B.V., Kilpatrick T.J., Dwyer T., Coulthard A., Chapman C., van der Mei I., Williams D., McMichael A.J.

*Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination.* Neurology 2011; 76(6):540-8.

Lublin F.D. New multiple sclerosis phenotypic classification. Eur Neurol. 2014;72(Suppl 1):1-5.

**Mackie K.** *Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do.* Journal of Neuroendocrinology. 2008; 20 Suppl 1(s1):10-4.

**Maltman D.J., Hardy S.A., Przyborski S.A.** *Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair.* Neurochem. Int. 2011; 59:347–356.

**Mannara, F., Valente, T., Saura, J., Graus, F., Saiz, A., et al.** *Passive Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 with MOG: Evidence of Involvement of B Cells.* 2012; PLOS ONE 7(12): e52361.

**Mannucci, C., Navarra, M., Calapai, F., Spagnolo, E.V., Busardò, F.P., Cas, R.D., Ippolito, F.M., Calapai, G.** *Neurological Aspects of Medical Use of Cannabidiol.* CNS Neurol Disord Drug Targets. 2017;16(5):541-553.

**Maresz, K., Carrier, E.J., Ponomarev, E.D., Hillard, C.J., Dittel, B.N.** *Modulation of the cannabinoid. CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli.* J. Neurochem. 2005;95, 437-445.

**McAllister, S.D., Murase, R., Christian, R.T., Lau, D., Zielinski, A.J., Allison, J., et al.,** *Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis.* Breast Cancer Res Treat. 2011; 129(1):37–47.

**McKallip, R.J., Jia, W., Schlomer, J., Warren, J.W., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M.** *Cannabidiol-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells: A Novel Role of Cannabidiol in the Regulation of p22phox and Nox4 Expression.* Mol Pharmacol, 2006; 70.

**Mecha M., Feliú A., Iñigo P.M., Mestre L., Carrillo-Salinas F.J., Guaza C.** *Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors.* Neurobiol Dis. 2013b; 59:141-50.

**Mecha, M., Feliú, A., Machín, I., Cordero, C., Carrillo-Salinas, F., Mestre, L., Hernández-Torres, G., Ortega-Gutiérrez, S., López-Rodríguez, M.L., de Castro, F., Clemente, D., Guaza, C.** *2-AG limits Theiler's virus induced acute neuroinflammation by modulating microglia and promoting MDSCs.* Glia. 2018; 66(7):1447-1463.

**Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., & Grunfeld, Y.** *Chemical basis of hashish activity.* Science; 1970, 169(3945), 611-612.

**Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z.** *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.* Biochem Pharmacol; 1995; 50(1):83-90.



**Mechoulam, R., Parker, L.A., Gallily, R.** *Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects*. J Clin Pharmacol. 2002; 42(11S):11S -19S.

**Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L.O.** *Cannabidiol –recent advances*. Chem Biodivers. 2007; 4: 1678-1692.

**Meeker RB, Williams K, Killebrew DA, Hudson LC.** *Cell trafficking through the choroid plexus*. Cell adhesion & migration. 2012; 6:390–6.

**Meseguer-Olmo, L., Montellano, A. J., Martínez, T., Martínez, C. M., Revilla-Nuin, B., Roldón, M., Fuente, T.** *Intraarticular and intravenous administration of 99MTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells (99MTC-AH-MSCS): In vivo imaging and biodistribution*. Nuclear Medicine and Biology.2017; 46: 36–42.

**Mielcarz, D.W., Kasper, L.H.** *The gut microbiome in multiple sclerosis*. Curr Treat Options Neurol. 2015; 17: 344.

**Mikuriya, T. H.** *Marijuana in medicine: past, present and future*. California Medicine. 1969; 110(1), 34–40.

**Miller, A.** *Handbook of Multiple Sclerosis*. Clinical features. En: Cook SD (Ed). New York: Marcel Dekker. 1990:169-186.

**Mitra, N.K., Bindal, U., Eng Hwa, W., Chua, C.L., Tan, C.Y.** *Evaluation of locomotor function and microscopic structure of the spinal cord in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis following treatment with syngeneic mesenchymal stem cells*. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(10):12041-52.

**Mitrovič, M., Patsopoulos, N.A., Beecham, A.H., Dankowski, T., Goris, A., Dubois, B.** *Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk*. Cell. 2018;175(6):1679-1687.e7.

**Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H-P., Zettl, U.K.** *Animal models of multiple sclerosis-Potentials and limitations*. Prog Neurobiol. 2010; 92(3):386-404.

**Molina-Holgado, F., Rubio-Araiz, A., Garcia-Ovejero, D., Williams, R.J., Moore, J.D., Arevalo-Martin, A., Gomez-Torres, O., Molina-Holgado, E.** *CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation*. Eur. J. Neurosci. 2007; 25:629-634.

**Montalban, X., Gold, R., Thompson, A.J., Otero-Romero, S., Amato, M.P., Chandraratna, D., et al.** *ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis*. Mult Scler J. 2018; 24(2):96-120.

**Moreno, I., Sanchez, A.J., Garcia-Merino A.** *Evaluation of the tolerability and efficacy of Sativex in multiple sclerosis*. Expert Rev Neurother 2014; 14(11): 1243-50

**Moreno, M., Guo, F., Mills Ko, E., Bannerman, P., Soulika, A., Pleasure, D.** *Origins and significance of astrogliosis in the multiple sclerosis model, MOG peptide EAE.* J Neurol Sci. 2013;333(1-2):55–59.

**Msif.** *Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World.* Mult Scler Int Fed. 2013; 1–28. PMID 4162299. <http://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/>

**Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M.** *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.* Nature; 1993; 365(6441):61-5.

**Murase, R., Kawamura, R., Singer, E., Pakdel, A., Sarma, P., Judkins, J., et al.** *Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer.* Br J Pharmacol. 2014; 171 (19):4464–4477.

**Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H.** *Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu.* Cytokine Growth Factor Rev. 2001; 12(1):53-72.

**Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H.** *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses.* Annu Rev Immunol. 2001; 19:423-74.

**Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Angelats, E., Etayo, Í., Reyes-Resina, I., Pulido-Salgado, M., Rodríguez-Pérez, A.I., Canela, E.I., Saura, J., Lanciego, J.L., Labandeira-García, J.L., Saura, C.A., Fuxe, K., Franco, R.** *Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia.* Brain Behav Immun. 2018; 67:139-151.

**Nishimoto N, Kishimoto T.** *Interleukin 6: from bench to bedside.* Nat Clin Pract Rheumatol. 2006; 2 (11):619-626.

**Nissen, J.C., Thompson, K.K., West, B.L., Tsirka, S.E.** *Csf1R inhibition attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes recovery.* Exp Neurol. 2018; 307:24–36.

**Nouri, M., Bredberg, A., Weström, B., Lavasani, S.** *Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells.* PloS one. 2014; 9(9): e106335.

**Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T.** *Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor.* Biochem Biophys Res Commun. 2007; 362(4):928-34.

**Okamura, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K.** *Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18.* Curr Opin Immunol. 1998; 10 (3): 259-64.

**Okuda, Y., Sakoda, S., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., Yanagihara, T.** *IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35–55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis.* Journal of Neuroimmunology. 1999; 101:188–196.

**Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C.C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T. et al.** *IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein.* Int Immunol. 1998; 10:703–8.

**Olsson T.** *Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma.* J Neuroimmunol. 1992;40(2-3):211-8.

**O'Mara, S.** *The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us.* J Anat. 2005; 207: 271–82.

**Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasent, L. Uhl, G.R.** *Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 2006; 1074:514-536.

**Ortiz, G.G., Pacheco-Moisés, F.P., Macías-Islas, M.Á., Flores-Alvarado, L.J., Mireles-Ramírez M.A., González-Renovato, E.D., Hernández-Navarro, V.E., Sánchez-López, A.L., Alatorre-Jiménez, M.A.** *Role of the Blood–Brain Barrier in Multiple Sclerosis.* Arch Med Res. 2014; 45: 687-97.

**Palazuelos, J., Aguado T., Egia A., Mechoulam R., Guzmán M., Galve-Roperh I.** *Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation.* Faseb j. 2006; 20(13): 2405-2407.

**Pan, J., Jin, J.L., Ge, H.M., et al.** *Malibatol A regulates microglia M1/M2 polarization in experimental stroke in a PPARγ-dependent manner.* J Neuroinflammation. 2015; 12:51.

**Patel, S.A., Sherman, L., Munoz, J., Rameshwar, P.** *Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2008 ;56(1):1–8.

**Paterson, P.Y.** *Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells.* J. Exp.Med. 1960; 111:119-136.

**Park, E.J., Oh, S.Y., Kim, Y., Yoon, C., Lee, B.S., Kim, S.D., Kim, J.S.** *Distribution and immunotoxicity by intravenous injection of iron nanoparticles in a murine model.* J Appl Toxicol. 2016; 36(3):414-23.

**Parker, L.A., Rock, E.M., Limebeer, C.L.** *Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids.* Br J Pharmacol. 2011; 163(7):1411-22.

**Payne, N.L., Sun, G., McDonald, C., Moussa, L., Emerson-Webber, A., Loisel-Meyer, S., Medin J.A., Siatskas, C., Bernard, C.C.** *Human adipose-derived mesenchymal stem*

cells engineered to secrete IL-10 inhibit APC function and limit CNS autoimmunity. *Brain Behav. Immun.* 2013; 30:103–114.

Pérez-Gómez, E., Andradas, C., Flores, J.M., Quintanilla, M., Paramio, J.M., Guzmán, M., Sánchez, C. *The orphan receptor GPR55 drives skin carcinogenesis and is upregulated in human squamous cell carcinomas.* *Oncogene.* 2013; 32(20):2534-42.

Perras, C., *Sativex for the Management of Multiple Sclerosis Symptoms.* *Issues in Emerging Health Technologies.* 2005; 72:1–4.

Pertwee, R.G., *Targeting the Endocannabinoid System with Cannabinoid Receptor Agonists: Pharmacological Strategies and Therapeutic Possibilities.* *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 2012;367(1607):3353–63.

Petty, M.A., Lo, E.H. *Junctional complexes of the blood–brain barrier: permeability changes in neuroinflammation.* *Prog Neurobiol.* 2002; 68(5):311- 323.

Pietr, M., Kozela, E., Levy, R., Rimmerman, N., Lin, Y.H., Stella, N., et al. *Differential changes in GPR55 during microglial cell activation.* *FEBS Lett.* 2009; 583:2071–2076.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* *Science.* 1999, 284: 143-147.

Popescu, B.F.G., Lucchinetti, C.F. *Pathology of demyelinating diseases.* *Annu Ev Pathol* 2012; 7:185-217.

Poznanski, S.M., Lee, A.J., Nham, T., Lusty, E., Larché, M.J., Lee, D.A., Ashkar, A.A. *Combined Stimulation with Interleukin-18 and Interleukin-12 Potently Induces Interleukin-8 Production by Natural Killer Cells.* *J Innate Immun.* 2017;9(5):511-525.

Praksova, P., Stourac P., Bednarik J., Vlckova E., Mikulkova Z., Michalek, J. *Immunoregulatory T Cells in Multiple Sclerosis and the Effect of Interferon Beta and Glatiramer Acetate Treatment on T Cell Subpopulations.* *Journal of the Neurological Sciences.* 2012; 319(1–2):18–23.

Prenderville, J.A., Kelly, Á.M., Downer, E.J. *The role of cannabinoids in adult neurogenesis.* *Br J Pharmacol.* 2015; 172(16):3950-63.

Pugliatti, M., Rosati, G., Carton, H., Riise, T., Drulovic, J., Vécsei, L., Milanov, I. *The epidemiology of multiple sclerosis in Europe.* *Eur J Neurol.* 2006; 13(7):700-22.

Qin, N., Neeper, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., Flores, C.M. *TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons.* *J Neurosci.* 2008; 28(24):6231-8.

- Radwan, M.M., Elsohly, M.A., Slade, D., Ahmed, S.A., Khan, I.A., Ross, S.A.** *Biologically active cannabinoids from high-potency Cannabis sativa. Journal of natural products.* 2009; 72(5):906-911.
- Raphael, I, Nalawade, S., Eagar, T.N., Forsthuber, T.G.** *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases.* Cytokine. 2015; 74:5-17.
- Ribeiro, A., Almeida, V.I., Costola-de-Souza, C., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Vitoretti, L.B., Gimenes-Junior, J.A., Akamine, A.T., Crippa, J.A., Tavares-de-Lima, W., Palermo-Neto, J.,** *Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury.* Immunopharmacol Immunotoxicol. 2015; 37:35–41.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martínez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrié, P., Brelière, J.C., Le Fur, G.L.** *SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor.* FEBS Lett. 1994; 350(2-3):240-4.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J.M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Brelière, J.C., Le Fur, G.L.** *SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor.* J Pharmacol Exp Ther; 1998; 284(2):644-50.
- Rivera, F.J., Couillard-Despres, S., Pedre, X., Ploetz, S., Caioni, M., Lois, C., Bogdahn, U., Aigner, L.** *Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells.* Stem Cells. 2006; 24:2209–2219.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., Berry, G.P.** *J. Exp. Medicina.* 1933; 58:39–56.
- Rivers, T.M.** *Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys.* J Exp Med. 1935 ;61(5):689-702.
- Robey P.G.** *Stem cells near the century mark.* J. Clin. Investig. 2000; 105:1489–1491.
- Robinson, A.P., Harp, C.T., Noronha, A., Miller, S.D.** *The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment.* Handb Clin Neurol. 2014; 122:173–189.
- Rock, E.M., Bolognini, D., Limebeer, C.L., et al.** *Cannabidiol, a non-psychotropic component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus.* Br J Pharmacol. 2012; 165(8):2620-34.
- Rook, G.A.** *Hygiene hypothesis and autoimmune diseases.* Clin Rev Allergy Immunol. 2012; 42(1):5-15.
- Roufosse, C.A., Direkze, N.C., Otto W.R., Wright, N.A.** *Circulating Mesenchymal Stem Cells.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2004; 36(4): 585–97.

**Rovaris, M., Gass, A., Bammer, R., Hickman, S., Ciccarelli, O., Miller, D., Filippi, M.** *Diffusion MRI in multiple sclerosis*. Neurology. 2005; 65(10):1526-32.

**Ruhl, T., Kim, B.S., Beier, J.P.** *Cannabidiol restores differentiation capacity of LPS exposed adipose tissue mesenchymal stromal cells*. Exp Cell Res. 2018; 370(2):653-662.

**Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J.** *The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor*. Br J Pharmacol. 2007; 152(7):1092-101.

**Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P., Bulman, D., Hashimoto, L., Paty, D.W., et al.** *A population-based study of multiple sclerosis in twins: update*. Ann Neurol 1993; 33:281-285.

**Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M.R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J. P., Tolon, R. M., Mechoulam, R., Brouillet, E., Romero J., Fernández-Ruiz, J.** *Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease*. Glia.2009; 57(11):1154-1167.

**Salem, H.K., Thiernemann, C.** *Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status*. Stem Cells (Dayton, Ohio).2010; 28(3): 585–96.

**Saliba, S.W., Jauch, H., Gargouri, B., et al.** *Anti-neuroinflammatory effects of GPR55 antagonists in LPS-activated primary microglial cells*. J Neuroinflammation. 2018; 15(1):322.

**Sánchez, A.J., Román-Vega, L., Ramil, E., et al.** *Regulation of cannabinoid receptor gene expression and endocannabinoid levels in lymphocyte subsets by interferon- $\beta$ : a longitudinal study in multiple sclerosis patients*. Clin Exp Immunol. 2015; 179(1):119-27.

**Sánchez, A.J., González-Pérez, P., Galve-Roperh, I., et al.** *WIN-2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: partial involvement of the CB (2) receptor*. Biochem Pharmacol. 2006; 72(12):1697-706.

**Sánchez, A.J., García-Merino, A.** *Neuroprotective agents: cannabinoids*. Clin Immunol 2012; 142(1):57-67.

**Sánchez, A.J., Román-Vega, L., Ramil Tojeiro, E., Giuffrida, A., García-Merino A.** *Regulation of Cannabinoid Receptor Gene Expression and Endocannabinoid Levels in Lymphocyte Subsets by Interferon-B: A Longitudinal Study in Multiple Sclerosis Patients*. Clinical and Experimental Immunology.2015; 179(1):119–27.

**Sánchez, A.J., González-Pérez, P., Galve-Roperh, I., García-Merino, A.** *R-(+)-[2,3-Dihydro-5-Methyl-3-(4-Morpholinylmethyl)-Pyrrolo-[1,2,3-De]-1,4-Benzoxazin-6-Yl]-1-Naphtalenylmethanone (WIN-2) Ameliorates Experimental Autoimmune*

*Encephalomyelitis and Induces Encephalitogenic T Cell Apoptosis: Partial Involvement of the CB (2) Receptor.* Biochemical Pharmacology.2006; 72(12): 1697–1706.

**S**argent, A., Miller, R.H. *MSC Therapeutics in Chronic Inflammation.* Curr Stem Cell Rep. 2016; 2(2):168-173.

**S**awzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H., et al. *Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52,  $\psi$ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain.* Mol Brain Res. 1999; 64:193–198.

**S**chaefer, P., Grant, E., González, G. *Diffusion-weighted MR imaging of the Brain.* Radiology. 2000; 217: 331 -345.

**S**cheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6.* Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2011; 1813:878–888.

**S**chmitt, C., Strazielle, N., Ghersi-Egea, J. F. *Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain.* Journal of neuroinflammation. 2012; 9:187.

**S**chrepfer, S., Deuse, T., Reichenspurner, H., Fischbein, M.P., Robbins, R.C., Pelletier, M.P. *Stem cell transplantation: the lung barrier.* Transplant Proc. 2007; 39:573–576.

**S**chubart, C.D., Sommer, I.E.C., Fusar-Poli, P., de Witte, L., Kahn, R.S., Boks, M.P.M. *Cannabidiol as a potential treatment for psychosis.* European Neuropsychopharmacology. 2014; 24(1):51-64.

**S**cutt, A., Williamson, E.M. *Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors.* Calcif Tissue Int. 2007; 80(1):50-9.

**S**eeman, P. *Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose.* Transl Psychiatry. 2016; 6(10): e920.

**S**ellner, J., Kraus, J., Awad, A., Milo, R., Hemmer, B., Stüve, O. *The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis-A critical analysis of potential environmental factors.* Autoimmun Rev. 2011; 10(8):495-502.

**S**erada, S., Fujimoto, M., Mihara, M., Koike, N., Ohsugi, Y., Nomura, S. et al. *IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:9041–6.

**S**erafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., Aloisi, F. *Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain.* J Exp Med. 2007; 204: 2899-912.



**Shi, F.D., Takeda, K., Akira, S., Sarvetnick, N., Ljunggren, H.G.** *IL-18 Directs Autoreactive T Cells and Promotes Autodestruction in the Central Nervous System Via Induction of IFN- $\gamma$  by NK Cells.* The Journal of Immunology. 2000; 65(6):3099-3104.

**Silvestro, S., Mammana, S., Cavalli, E., Bramanti, P., Mazzon, E.** *Use of Cannabidiol in the Treatment of Epilepsy: Efficacy and Security in Clinical Trials.* Molecules. 2019; 24(8). pii: E1459.

**Singh, V., Prajeeth, C.K., Gudi, V., Bénardais, K., Voss, E.V., Stangel, M.** *2-Chlorodeoxyadenosine (cladribine) induces apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells.* Clin Exp Immunol. 2013;173(2):288-97.

**Sisay, S., Pryce, G., Jackson, S.J., Tanner, C., Ross, R.A., Michael, G.J., Selwood, D.L., Giovannoni, G., Baker, D.** *Genetic background can result in a marked or minimal effect of gene knockout (GPR55 and CB2 receptor) in experimental autoimmune encephalomyelitis models of multiple sclerosis.* PLoS One 2013;8(10):e76907.

**Soroceanu, L., Murase, R., Limbad, C., Singer, E.L., Allison, J., Adrados, I., Kawamura, R., Pakdel, A., Fukuyo, Y., Nguyen, D., Khan, S., Arauz, R., Yount, G.L., Moore, D.H., Desprez, P.Y., McAllister, S.D.** *Id-1 is a key transcriptional regulator of glioblastoma aggressiveness and a novel therapeutic target.* Cancer Res. 2012; 73 (5):1559–1569.

**Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., Moretta, L.** *Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2.* Blood. 2008; 111(3):1327-33.

**Steinman, L.** *Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy.* Neuron 1999; 24:511–514.

**Stromnes, I.M., Goverman, J.M.** *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis.* Nature Protocols.2006;1:1952–1960.

**Stromnes, I. M., Goverman, J. M.** *Active induction of experimental allergic encephalomyelitis.* Nat. Protoc. 2006; 1:1810-1819.

**Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., Goverman, J.M.** *Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells.* Nat Med. 2008;14(3):337–342.

**Sugiura, T., Waku, K.** *Cannabinoid receptors and their endogenous ligands.* J Biochem. 2002;132(1):7-12.

**Sun, B., Zhang, X., Wang, G., Kong, Q., Mu, L., Wang, J., Zhang, S., Liu, Y., Li, R., Liu, L., Tian, Y., An, Y., Li, H.** *Regulation of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on the encephalitogenic potential of MBP68-86-specific lymphocytes.* J Neuroimmunol. 2010; 226(1-2):116-25.

**Sung, R., Choi, Howell, O.W., Carassiti, D., Magliozzi, R., Gveric, D., Muraro, P.A., et al.** *Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis.* *Brain.* 2012;135(10):2925-37.

**Tabitha A. Iseger, Matthijs G. Bossong.** A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophrenia Research.* 2015; 162(1–3): 153-161.

**Takahashi K., Yamanaka, S.** *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* *Cell.* 2006; 126:663–676.

**Talavera Hernández, C., Flores-Aldana, M., Macías-Morales, N., Flores Rivera, J., Hernández Girón, C.** *Vitamin D and Multiple sclerosis: Scientific evidence.* *Neurol arg.* 2013; 5(4):250-258.

**Tavera-Mendoza, L.E.** *White JH Cell defenses and the sunshine vitamin.* *Sci Am.* 2007; 297:62-72.

**Teitelbaum, D., Aharoni, R., Klinger, E., Kreitman, R., Raymond, E., Malley, A., Shofti, R., Sela, M., Arnon, R.** *Oral glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical and immunological studies.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1029:239-249.

**Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., Pertwee, R.G.** *Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro.* *Br J Pharmacol.* 2007; 150(5):613-23.

**Thompson, A. et al.** *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria.* *The Lancet Neurology.* 2017;17(2):162 – 173.

**Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., Guinan, E.C.** *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation.* *Transplantation.* 2003;75(3):389–397.

**Tögel F, Yang Y, Zhang P, Hu Z, Westenfelder C.** Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295: F315–F321.

**Touw, M.** *The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet.* *Journal of Psychoactive Drugs,* (1981); 13(1):23–34.

**Tran, J.Q., Rana, J., Barkhof, F., et al.** *Randomized phase I trials of the safety/tolerability of anti-LINGO-1 monoclonal antibody BLI033.* *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2014; 1(2): e18.

**Ubogu, E.E., Callahan, M.K., Tucky, B.H., Ransohoff, R.M.** *Determinants of CCL5-driven mononuclear cell migration across the blood–brain barrier. Implications for therapeutically modulating neuroinflammation.* *J.Neuroimmunology.* 2006; 179(1-2): 132-144.

**Uccelli, A., Milanese, M., Principato, M.C., Morando, S., Bonifacino, T., Vergani, L., et al.** *Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis.* Mol Med. 2012; 18:794–804.

**Van der Star, B. J. et al.** *In vitro and in vivo models of multiple sclerosis.* CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2012; 11:570-588.

**Van Kaer, L., Postoak, J.L., Wang, C., Yang, G., Wu, L.** Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. Cell Mol Immunol. 2019;16(6):531-539.

**Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharkey, K.A.** *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors.* Science. 2005; 310:329–332.

**Walsh, S.K., Hepburn, C.Y., Kane, K.A., Wainwright, C.L.** *Acute administration of cannabidiol in vivo suppresses ischaemia-induced cardiac arrhythmias and reduces infarct size when given at reperfusion.* Br J Pharmacol. 2010;160(5):1234-42.

**Walter, L., Stella, N.** *Cannabinoids and neuroinflammation.* Br J Pharmacol. 2004; 141:775–85.

**Weber, M.S., Prod'homme, T., Patarroyo, J.C., et al.** *B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity.* Ann Neurol. 2010;68(3):369-83.

**Weiss, H.A., Millward, J.M., Owens, T.** *CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease.* J Neuroimmunol. 2007; 191:79–85.

**Willer, C.J., Dymment, D.A., Risch, N.J., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C; Canadian Collaborative Study Group.** *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(22):12877-82.

**William, M., Leroux, L.P., Chaparro, V., Graber, T.E., Alain, T., Jaramillo, M.** *Translational repression of Ccl5 and Cxcl10 by 4E-BP1 and 4E-BP2 restrains the ability of mouse macrophages to induce migration of activated T cells.* Eur J Immunol. 2019. Doi: 10.1002 / eji.201847857.

**Wilson, E.H., Weninger, W., Hunter, C.A.** *Trafficking of immune cells in the central nervous system.* J Clin Invest. 2010; 120:1368-79.

**Wimmer, I., Scharler, C., Zrzavy, T., Kadowaki, T., Mödler, V., Rojc, K., Tröschner, A.R., Kitic, M., Ueda, S., Bradl, M., Lassmann, H.** *Microglia pre-activation and neurodegeneration precipitate neuroinflammation without exacerbating tissue injury in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Acta Neuropathol Commun. 2019;7(1):14.

**Wu**, H.-Y., Chang, A.-C., Wang, C.-C., Kuo, F.-H., Lee, C.-Y., Liu, D.-Z., Jan, T.-R. *Cannabidiol induced a contrasting pro-apoptotic effect between freshly isolated and precultured human monocytes*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 246:141–147.

**Xiao**, J., Yang, R., Biswas, S., Qin, X., Zhang, M., Deng, W. *Mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells as therapies for multiple sclerosis*. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(5):9283-302.

302.

**Xu**, C., Mu, L., Roes, I., Miranda-Nieves, D., Nahrendorf, M., Ankrum, J. A., Karp, J. M. *Nanoparticle-based monitoring of cell therapy*. *Nanotechnology*.2001; 22(49), 494001.

**Yamada**, Y., Fujimoto, A., Ito, A., Yoshimi, R., Ueda, M. *Cluster Analysis and Gene Expression Profiles: A cDNA Microarray System-Based Comparison between Human Dental Pulp Stem Cells (hDPSCs) and Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) for Tissue Engineering Cell Therapy*. *Biomaterials*.2006; 27(20): 3766–81.

**Yang**, H., Zhou, J., Lehmann, C. *GPR55 – a putative “type 3” cannabinoid receptor in inflammation*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016;27(3):

**Yednock**, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., Karin, N. *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin*. *Nature*. 1992.;35

**Yoshimoto**, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K. *IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- $\gamma$  production*. *J. Immunol*.1998; 161:3400.

**Zamvil**, S.S., Mitchell, D.J., Moore, A.C., Kitamura, K., Steinman, L., Rothbard, J.B. *T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis*. *Nature*. 1986; 324:258-60.

**Zappia**, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., et al. *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. *Blood*. 2005; 106(5):1755–61.

**Zhang**, H.Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G.H., Yang, H.J., Liu, Q.R., Wu, J., Gardner, E.L., Bonci, A., Xi Z.X. *Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats*. *Addict Biol*. 2017; 22(3):752-765.

**Zhang**, Q.Z., Su, W.R., Shi, S.H., Wilder-Smith, P., Xiang, A.P., Wong, A., Nguyen, A.L., Kwon, C.W., Le, A.D. *Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of M2 macrophages and enhance cutaneous wound healing*. *Stem Cells*. 2010; 28:1856–1868.

**Zhang**, W.J., Cao, Y.L. *Stem cell, the basis for tissue and organ reconstruction*. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*.2005; 27(6):662–64.

**Z**iehn, M.O., Avedisian, A.A., Tiwari-Woodruff, S., Voskuhl, R.R. *Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE*. Lab Invest.2010; 90:774–86.

Capítulo

# 8

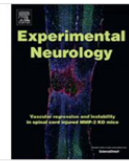
ANEXOS

## **ANEXO 1: Artículos y póster publicados relacionados con la tesis**



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexnr](http://www.elsevier.com/locate/yexnr)


Research paper

# Mechanisms of action of cannabidiol in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis



Coral González-García<sup>a</sup>, Irene Moreno Torres<sup>a</sup>, Ruth García-Hernández<sup>a</sup>, Lucía Campos-Ruiz<sup>a</sup>, Luis Rodríguez Esparragoza<sup>a</sup>, María José Coronado<sup>b</sup>, Aranzazu García Grande<sup>c</sup>, Antonio García-Merino<sup>a,d,1</sup>, Antonio J. Sánchez López<sup>a,d,1</sup>

<sup>a</sup> Neuroimmunology Unit, Puerta de Hierro Hospital Research Institute, Universidad Autónoma de Madrid, Joaquín Rodrigo, 2, 28222, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Confocal Microscopy Unit, Puerta de Hierro Hospital Research Institute, Universidad Autónoma de Madrid, Joaquín Rodrigo, 2, 28222, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Flow Cytometry Unit, Puerta de Hierro Hospital Research Institute, Universidad Autónoma de Madrid, Joaquín Rodrigo, 2, 28222, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Red Española de Esclerosis Múltiple (REEN), Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Experimental autoimmune encephalomyelitis  
Cannabinoid  
Cannabidiol

## ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is one of the most important compounds in Cannabis sativa, lacks psychotropic effects, and possesses a high number of therapeutic properties including the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The aim of this study was to analyse the relative efficacy of CBD in adoptively transferred EAE (at-EAE), a model that allows better delineation of the effector phase of EAE. Splenocytes and lymph nodes from mice with actively induced EAE were cultured in the presence of MOG<sub>35–55</sub> and IL-12 and inoculated intraperitoneally in recipient female C57BL/6J mice. The effects of CBD were evaluated using clinical scores and magnetic resonance imaging (MRI). In the central nervous system, the extent of cell infiltration, axonal damage, demyelination, microglial activation and cannabinoid receptors expression was assessed by immunohistochemistry. Lymph cell viability, apoptosis, oxidative stress and IL-6 production were measured in vitro. Preventive intraperitoneal treatment with CBD ameliorated the clinical signs of at-EAE, and this improvement was accompanied by a reduction of the apparent diffusion coefficient in the subiculum area of the brain. Inflammatory infiltration, axonal damage, and demyelination were reduced, and cannabinoid receptor expression was modulated. Incubation with CBD decreased encephalitogenic cell viability, increasing early apoptosis and reactive oxygen species (ROS) and decreasing IL-6 production. The reduction in viability was not mediated by CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> or GPR55 receptors. CBD markedly improved the clinical signs of at-EAE and reduced infiltration, demyelination and axonal damage. The CBD-mediated decrease in the viability of encephalitogenic cells involves ROS generation, apoptosis and a decrease in IL-6 production and may contribute to the therapeutic effect of this compound.

## 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common demyelinating disease of the central nervous system (CNS) and is characterized by the infiltration of inflammatory leukocytes into the CNS, followed by de-myelination and axonal loss (Seehusen and Baumgärtner, 2010; Sospedra and Martin, 2005). This results in a variety of neurological deficits that frequently lead to progressive disability (Prat and Antel, 2005). The pathogenesis of MS is not fully understood, and despite the

existence of approved medications, there remain a significant number of unmet therapeutic needs.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most commonly used animal model of MS and constitutes a versatile system in translational neuroimmunopharmacology. Active EAE is induced with self-antigens or CNS homogenates emulsified in adjuvant (Wekerle et al., 1994; Mendel et al., 1995; Amor et al., 1996). In addition, EAE can be induced by adoptive transfer (at-EAE) of lymphoid encephalitogenic cells specific for CNS antigens (Zamvil et al., 1986;

Corresponding authors at Neuroimmunology Unit, Puerta de Hierro Hospital Research Institute, Universidad Autónoma de Madrid, Joaquín Rodrigo, 2, 28222, Majadahonda, Madrid, Spain.

E-mail addresses: [coralgg@diphim.org](mailto:coralgg@diphim.org) (C. González-García), [irenenmt@diphim.org](mailto:irenenmt@diphim.org) (I.M. Torres), [rgarcia@diphim.org](mailto:rgarcia@diphim.org) (R. García-Hernández), [lc campos@diphim.org](mailto:lc campos@diphim.org) (L. Campos-Ruiz), [mjcoronado@diphim.org](mailto:mjcoronado@diphim.org) (M.J. Coronado), [agarcia@diphim.org](mailto:agarcia@diphim.org) (A.G. Grande), [jgarciam.hph@salud.madrid.org](mailto:jgarciam.hph@salud.madrid.org) (A. García-Merino), [asanchez@diphim.org](mailto:asanchez@diphim.org) (A.J. Sánchez López).<sup>1</sup>

Both authors are senior scientist.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.08.017>

Received 23 May 2017; Received in revised form 2 August 2017; Accepted 28 August 2017

Available online 01 September 2017

0014-4886/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



Kuchroo et al., 1992).

Compared with the classic active EAE, at-EAE is a more useful model to analyse the effector phase of the disease. Moreover, the encephalitogenic cells can also be manipulated in vitro to study the roles of specific biological agents before the cells are transferred to recipients.

The endocannabinoid system consists of the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, a number of endocannabinoid ligands and their degradation molecules. However, endocannabinoids and phytocannabinoids can stimulate other receptors such as the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel and the orphan G protein-coupled receptor 55 (GPR55) (Console-Bram et al., 2012). In several neurologic disorders such as MS (Baker et al., 2001; Moreno Torres et al., 2014), Alzheimer's, Parkinson's diseases (Fernández-Ruiz et al., 2015a) and amyotrophic lateral sclerosis (Pryce and Baker, 2015), the anti-inflammatory and neuroprotective effects of cannabinoids (CBs) have been examined. Furthermore, studies performed in EAE have shown that CBs ameliorate symptoms (spasticity, tremor, ataxia and pain), reduce inflammation and favour remyelination via CB<sub>1</sub>- and CB<sub>2</sub>-mediated mechanisms (Arevalo-Martin et al., 2003; Pryce et al., 2003; Fernández-Ruiz et al., 2008). However, the therapeutic potential of many of the CBs is limited due to their psychotropic effects, which are mediated by CB<sub>1</sub> receptors (Klein and Newton, 2007). The major non-psychoactive plant-derived cannabinoid, cannabidiol (CBD), which does not act through CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors, shares many beneficial effects with classic cannabinoids, including anti-inflammatory and immunomodulatory properties (Hammell et al., 2015; Ribeiro et al., 2015). Due to its lack of psychotropic effects, the therapeutic potential of CBD is currently under intensive investigation (Ibeas Bih et al., 2015; Lee et al., 2016).

Although CBD treatment was reported to decrease the severity of active EAE (Kozela et al., 2011), information about the effect of this compound on the effector phase of the disease is limited. Consequently, we designed this study to evaluate the potential therapeutic effect of CBD against adoptively transferred EAE and to elucidate its mechanisms of action in encephalitogenic spleen cells. We report here that CBD ameliorates clinical signs of at-EAE and triggers apoptosis in primary encephalitogenic spleen cells in vitro by inducing oxidative stress and reducing IL-6 levels in these cells.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Pathogen-free male and female C57BL/6 mice, 8 weeks of age, were purchased from Charles River Breeding Laboratories. On arrival, the mice were randomized, transferred to plastic cages containing 5 animals/cage, and quarantined for 1 week. The animals were given food and water ad libitum. The mouse holding rooms were kept at 21–24 °C and 40–60% relative humidity with a 12-hour/12-hour light/dark cycle. The animals were handled in accordance with the European Union animal care guidelines (2010/63/EU) and Spanish Government Regulations (Real Decreto 53/2013). All studies were carried out in accordance with the ARRIVE guidelines for animal research (Kilkenny et al., 2010; McGrath et al., 2010).

### 2.2. Induction of active EAE

EAE was induced in male mice using MOG<sub>35–55</sub> (Bionova) emulsified in a 1:1 ratio in complete Freund's adjuvant (CFA) containing 10 mg ml<sup>−1</sup> of Mycobacterium tuberculosis (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 250 µg of MOG<sub>35–55</sub> was dissolved in 100 µl of phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza) and mixed with an equal volume of CFA. On days 0 and 7, the MOG-CFA emulsion was subcutaneously (s.c.) injected (200 µl/mouse). The immune adjuvant pertussis toxin (PTX) (Sigma-Aldrich) was injected intraperitoneally (i.p.) (500 ng per mouse) on day 0 and 48 h later.

### 2.3. Encephalitogenic cells and at-EAE induction

After active induction of EAE, mice were sacrificed and lymph nodes and spleens were aseptically removed. Erythrocytes from the spleens were lysed with ACK solution (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA). Single-cell suspensions were prepared, and cells were cultured in a 1:5 ratio (lymph node cells:spleen cells) in DMEM (Lonza) supplemented with 100 units ml<sup>−1</sup> penicillin/streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM nonessential amino acids, 4 mM L-glutamine (Lonza) and 10% foetal bovine serum (Biowest).

Encephalitogenic cells ( $5 \times 10^6$  cells ml<sup>−1</sup>) were primed for 72 h with MOG<sub>35–55</sub> (25 µg ml<sup>−1</sup>) and IL-12 (25 ng ml<sup>−1</sup>) and then transferred i.p. to naive mice.

### 2.4. At-EAE and treatment groups

All drugs and their respective vehicles were injected i.p. immediately after EAE induction. The following groups of at-EAE mice were used in this study:

- 1) Control group (n = 5): at-EAE mice treated with cannabinoid vehicle (Solutol:ethanol:PBS at a ratio of 1:1:8).
- 2) CBD low-dose group (n = 7): at-EAE mice treated with 5 to 10 mg kg<sup>−1</sup> CBD.
- 3) CBD high-dose group (n = 7): at-EAE mice treated with 50 mg kg<sup>−1</sup> CBD.

The doses and duration of preventive treatment were based on previous research and published data.

CBD (GW Pharma) solutions were prepared before the experiment according to the manufacturer's instructions and stored for up to 1.5 months.

### 2.5. At-EAE monitoring

Mice were examined daily to record behavioural and neurological signs for 24 days after the immunization. Disease scores were assigned as follows: 0, asymptomatic; 1, partial loss of tail tonicity or soft weakness in hind limbs; 2, tail paralysis or mild weakness in hind limbs; 3, hind limb weakness or ataxia; 4, partial hind limb paralysis and ataxia; 5, total hind limb paralysis; 6, moribund.

On day 24, spinal cords were collected for further pathological and expression studies.

### 2.6. Magnetic resonance imaging (MRI)

Brain MRI was performed using a 7-Tesla scanner (7-T Bruker Pharmascan) on day 17. During imaging, the mice were anaesthetized with isoflurane and placed in a birdcage coil. An MR-compatible small animal monitoring system was used during imaging to monitor the respiratory and heart rates of the anaesthetized mice.

The following MRI parameters were calculated: quantitative T2 maps and apparent diffusion coefficient (ADC). Using guidance from mice brain atlases (Badea et al., 2007; Ullmann et al., 2013) we segmented the brain into the corpus callosum, hippocampus, subiculum, and basal ganglia, which were our defined regions of interest (ROI) in each slice. Histogram analysis was performed in the ROIs with ImageJ software (NIH).

### 2.7. Tissue preparation for H & E and immunohistochemical staining

After the mice were euthanised, lumbar spinal cords were collected and fixed in paraformaldehyde, embedded in OCT (Tissue-Tek Sakura) and cryosectioned for immunostaining.

For the haematoxylin and eosin (H & E) staining protocol, 3-µm-

thick sections were washed with distilled water to remove the OCT and stained with H & E (Sigma-Aldrich) to assess cell infiltration.

For immunofluorescence, the following antibodies were used in 8  $\mu$ M cryosections: anti-CD3 (Abcam; 1:20) for T cell infiltrate; anti-F4/80 (Abcam 8MB clone, 1:10) specific for macrophage infiltrate; SMI-32 (Abcam; 1:1000) for non-phosphorylated neurofilaments; anti-MBP (Abcam; 1:100) for myelin basic protein; anti-GFAP (Sigma; 1:800) for astrocytes; anti-Iba-1 (Wako; 1:400) for microglia; anti-GPR55 (Abcam; 1:50) for GPR55 receptors; anti-CB1 (Abcam; 1:50) for CB1 receptor; anti-CB2 (Abcam; 1:50) for CB2 receptor. TO-PRO (Invitrogen; 1:1000) was used to visualize the cellular nuclei. Confocal microscopy analysis was performed with a Leica TCS SP5 microscope (Wetzlar, Germany) acquiring images through the LAS AF program (Leica).

## 2.8. Spleen cell viability

Viability was assessed with the tetrazolium dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. Cells ( $0.3 \times 10^6$ ) were cultured in 96-well plates; activated with MOG<sub>35–55</sub> and IL-12 at 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and 25 ng ml<sup>-1</sup>, respectively; and incubated with CBD (1, 5 and 10  $\mu$ M) in supplemented DMEM medium. After 48 h, cells were incubated with MTT solution for 3–4 h, and the developed crystals were dissolved with acidified isopropanol 0.4 N. Finally, absorbance was measured at 490 nm in a Multiskan EX spectrophotometer (Thermo Electron Corporation). To analyse the interaction of cannabinoid antagonists or agonists with CBD treatment, we pretreated cells for 15–30 min with the CB<sub>1</sub> antagonist SR141716 (SR1; Sanofi) and the CB<sub>2</sub> antagonist SR144528 (SR2; Cayman) or the GPR55 agonist LPI (Sigma) before CBD incubation.

## 2.9. Apoptosis

Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>) were cultured in a 24-well plate (0.5 ml well<sup>-1</sup>) and incubated with CBD (5 and 10  $\mu$ M) or vehicle (ethanol) for 24 h. After the incubation time, the splenocytes were washed twice with PBS and resuspended in binding buffer (BD). Annexin V-fluorescein isothiocyanate (annexin V-FITC; BD) and blue-fluorescent DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) dihydrochloride solutions were added to the splenocytes following the manufacturer's instructions. After incubation at room temperature for 15 min in the dark, the single-cell fluorescence of 20,000 live cells for each sample was measured using a flow cytometer (MACSQuant Miltenyi Biotec). Annexin V was detected in the green channel (550/50 nm), and DAPI in the blue channel (450/50 nm). Early apoptosis was presented as re-lative units of annexin V-positive DAPI-negative cells, with the vehicle control expressed as 1. Data were analysed using the software MACSQuantify (Miltenyi Biotec).

## 2.10. Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS)

Splenocytes ( $1 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>) were preincubated with dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; 20  $\mu$ M) for 15 min at 37 °C and then washed twice with complete DMEM. The splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>), once loaded with DCF-DA, were cultured in tri-plicate in a 24-well plate (0.5 ml well<sup>-1</sup>) and treated with CBD (5 and 10  $\mu$ M) or vehicle (ethanol) for 6 h. After the cells were washed with PBS, single-cell fluorescence was measured by confocal microscopy with a Leica TCS SP5 microscope (Wetzlar, Germany), acquiring images through the LAS AF program (Leica). ROS levels were presented as relative units of DCF-DA-positive cells, with the vehicle control defined as 1. The same cultures were analysed with a flow cytometer (MACSQuant Miltenyi Biotec).

## 2.11. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IL-6

Cell-conditioned media from the viability experiment were collected and assayed for IL-6 production. Briefly, encephalitogenic spleen cells cultured with MOG<sub>35–55</sub> and an IL-12 stimulus were incubated in 96-well plates with CBD at final concentrations of 5 or 10  $\mu$ M or with their vehicle (EtOH). After 48 h of incubation at 37 °C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>, the culture media were analysed for IL-6 by ELISA using specific antibodies and the procedures recommended by the supplier (R & D Systems). The incubation time of 48 h was chosen based on preliminary experiments (data not shown).

## 2.12. Statistical analysis

At-EAE clinical disease scores for each group were represented as the mean  $\pm$  SEM. Differences between at-EAE and treatment scores were analysed using ANOVA followed by a Tukey test. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  were considered statistically significant. A descriptive analysis for ex vivo and in vitro assays was performed; for categorical variables, the absolute and relative frequencies were obtained, whereas the mean and standard deviation or the median and the 25th and 75th percentiles were used for numeric variables. Hypothesis tests were performed with the Kruskal-Wallis test in the case of more than two groups and the Mann-Whitney U test for post hoc analyses and comparisons between two groups. The significance level was set at 0.05. Bonferroni correction was applied in the case of multiple comparisons. Statistical analysis was performed with the Stata/IC v.14.1 package (StataCorp 2015, Stata Statistical Software, Release 14, College Station, TX).

## 3. Results

### 3.1. CBD ameliorates clinical signs in at-EAE

CBD was administered by i.p. injection with increasing doses from 5 to 10 mg kg<sup>-1</sup> three times per week, with 0.5 mg kg<sup>-1</sup> increments in

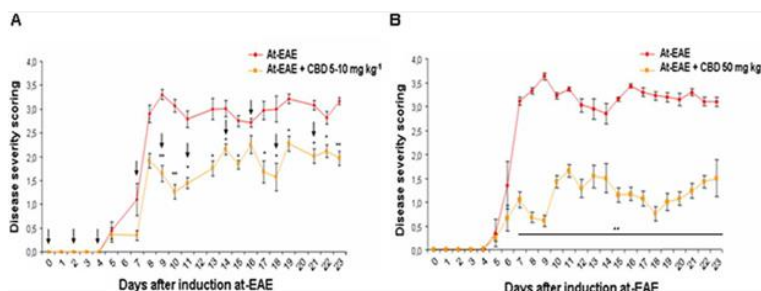


Fig. 1. Preventive CBD treatment reduces clinical signs in a dose-dependent manner. Graphs show the clinical score progression of the at-EAE model ( $n = 5$ ) and the CBD-treated mice over the experimental period. (A) CBD was applied in increasing doses from 5 to 10 mg kg<sup>-1</sup> ( $n = 7$ ). Black arrows indicate the days of treatment. Values of \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  were considered statistically significant. (B) Clinical disease scores were evaluated in the group treated daily with CBD at 50 mg kg<sup>-1</sup> from day 0 ( $n = 7$ ). \*\* $p < 0.01$  was found from day 7 to the end of the experiment.

Table 1

Represents the values of the indicated parameters as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using ANOVA followed by a Tukey test. Values of \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  were considered statistically significant.

Experimental group	Disease incidence	Mortality	Day disease onset	Mean maximum score	Mean cumulative score
At-EAE	(5/5)	0	6.5 $\pm$ 0.65	3.35 $\pm$ 0.10	53.25 $\pm$ 2.99
At-EAE + CBD 5 to 10 mg kg <sup>-1</sup>	(7/7)	0	6.5 $\pm$ 0.65	2.65 $\pm$ 0.20*	34.36 $\pm$ 2.62**
At-EAE	(5/5)	0	5.5 $\pm$ 0.71	3.64 $\pm$ 0.11	55.53 $\pm$ 1.07
At-EAE + CBD 50 mg kg <sup>-1</sup>	(7/7)	0	5.5 $\pm$ 1.29	1.66 $\pm$ 0.26**	20.84 $\pm$ 2.94**

each injection. As shown in Fig. 1A, CBD administration resulted in an important amelioration of the disease signs compared with the at-EAE control group. Fig. 1B shows a much higher therapeutic effect when CBD was injected daily at a dose of 50 mg kg<sup>-1</sup>. In both therapeutic approaches (Fig. 1A and B), clinical signs in the control group reached a maximum score of 3.5. CBD at low and high doses significantly reduced the mean of the maximum score. Furthermore, the mean of the cumulative score was also significantly reduced in both cases (Fig. 1 and Table 1).

Animals treated with 50 mg kg<sup>-1</sup> CBD did not show signs of lethargy, catalepsy, changes in food intake or any other evidence of toxicity compared with animals receiving the lower dose of the drug. Considering the higher clinical effect and the absence of clinical toxicity, a CBD dose of 50 mg kg<sup>-1</sup> was used for the rest of the experiments.

### 3.2. CBD treatment diminishes ADC in the ventral subiculum area, but MRI reveals no ventricular variation

No difference in ventricular size between the at-EAE and CBD-treated groups (Fig. 2A) was detected by MRI. However, histogram analysis of the ADC showed a tendency to diminish in the basal ganglia, hippocampus, and corpus callosum of CBD-treated mice. Significant differences were found only between the at-EAE and at-EAE + CBD groups in the ventral subiculum area (Fig. 2B). Representative regions of the subiculum (dark green), hippocampus (light green), basal ganglia (light blue) and corpus callosum (red) are shown in Fig. 2C. Increased signal in this area could be consistent with periventricular inflammation in the absence of treatment in the at-EAE group. CBD could exert an anti-inflammatory effect in select sites within the brain parenchyma.

### 3.3. CBD decreases cell infiltration in the CNS

Next, we evaluated cell infiltration in histological sections from the lumbar spinal cords of each group on day 24 after at-EAE induction. As shown in Fig. 3A, staining with H & E, anti-CD3 and anti-F4/80 revealed the presence of T cell and macrophage infiltration with meningeal involvement, which was absent in healthy controls and was markedly attenuated by 50 mg kg<sup>-1</sup> CBD. Quantification of the impact of CBD on those cell populations revealed a deep reduction in the numbers of T cells and macrophages ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3B).

### 3.4. CBD reduces axonal damage and demyelination

The analysis of spinal cord damage and demyelination was performed on day 24 post induction to determine the presence of non-phosphorylated neurofilaments (SMI-32) and myelin basic protein (MBP). SMI-32 labelling revealed extensive axonal degeneration in the at-EAE group compared with healthy controls. In contrast, CBD-treated (50 mg kg<sup>-1</sup>) at-EAE mice showed less axonal damage (Fig. 4A, left column). MBP staining showed demyelinated areas in the lumbar spinal cord of at-EAE. In the CBD group, the demyelinated areas were less extensive (Fig. 4A, right column).

Quantification of the effect of CBD on axonal damage and demyelination was significant for both parameters, at  $p < 0.001$  and

$p < 0.05$ , respectively (Fig. 4B upper and lower panels).

### 3.5. CBD decreases microglia activation in at-EAE

Immunofluorescence was conducted for the presence of Iba-1 and GFAP, which are microglia and astrocyte markers, respectively; the results are shown in Fig. 5A. Whereas astrocyte labelling did not show significant differences in any group of mice, at-EAE showed an increased expression level of the microglia marker compared with the control group ( $p < 0.05$ ), and the augmented expression was significantly reduced by CBD ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5B).

### 3.6. CBD modifies GPR55 and CB<sub>2</sub> receptor expression in the CNS

The canonical cannabinoid receptors, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>, were evaluated at the protein level (Fig. 6A). CB<sub>1</sub> was extensively expressed in the lumbar spinal cord sections; however, at-EAE induction caused a significant reduction in the levels of this receptor ( $p < 0.01$ ), and the levels were not restored by preventive CBD treatment (Fig. 6B). In contrast, CB<sub>2</sub> was found in scarce levels in healthy control mice, whereas its expression was markedly increased in the at-EAE group ( $p < 0.01$ ); CBD caused a significant reduction of CB<sub>2</sub> expression in treated animals ( $p < 0.01$ ) (Fig. 6B).

Since it is known that CBD antagonizes the orphan receptor GPR55, and given the reported presence of this receptor in the CNS (Ross, 2009; Ryberg et al., 2009) we analysed whether the treatment with CBD could affect the expression of GPR55 in the lumbar spinal cord of at-EAE mice (Fig. 6A). GPR55 was found at very low levels in healthy controls, but at-EAE was associated with a significant increase in the level of this receptor ( $p < 0.001$ ). However, CBD-treated mice did not show such an increase, instead showing a significant reduction of GPR55 compared with untreated mice. ( $p < 0.001$ ) (Fig. 6B).

### 3.7. CBD decreases encephalitogenic cell viability and IL-6 production and increases apoptosis and ROS levels

Encephalitogenic spleen cells were cultured in the presence of MOG<sub>35–55</sub> and IL-12, based on the in vivo assay conditions. Treatment with 10  $\mu$ M CBD for 48 h reduced the viability of these activated cells, while lower doses did not modify cell viability (Fig. 7A).

Despite the fact that CBD exerts various actions through the GPR55 receptor, in our hands CBD did not decrease the viability of spleen cells through GPR55, CB<sub>1</sub>, or CB<sub>2</sub> receptors (Fig. 7B). The use of SR141716 and SR144528 (CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor antagonists, respectively) or LPI (an endogenous ligand of GPR55) did not reverse the effect of CBD.

It is known that CBD induces apoptosis of monocytes and certain normal and transformed lymphocytes, including thymocytes and splenocytes, through oxidative stress and increased ROS levels (McKallip et al., 2006; Lee et al., 2008; Wu et al., 2010). We analysed whether apoptosis could be involved in the decrease in cell viability. Analysis of early apoptosis showed that CBD significantly increased this parameter in cells incubated with 5 or 10  $\mu$ M CBD for 24 h (Fig. 7C).

To analyse whether ROS increased in self-reactive spleen cells after CBD incubation, we preloaded splenocytes with DCF-DA, stimulated them with MOG<sub>35–55</sub> and IL-12, and incubated them with CBD at the



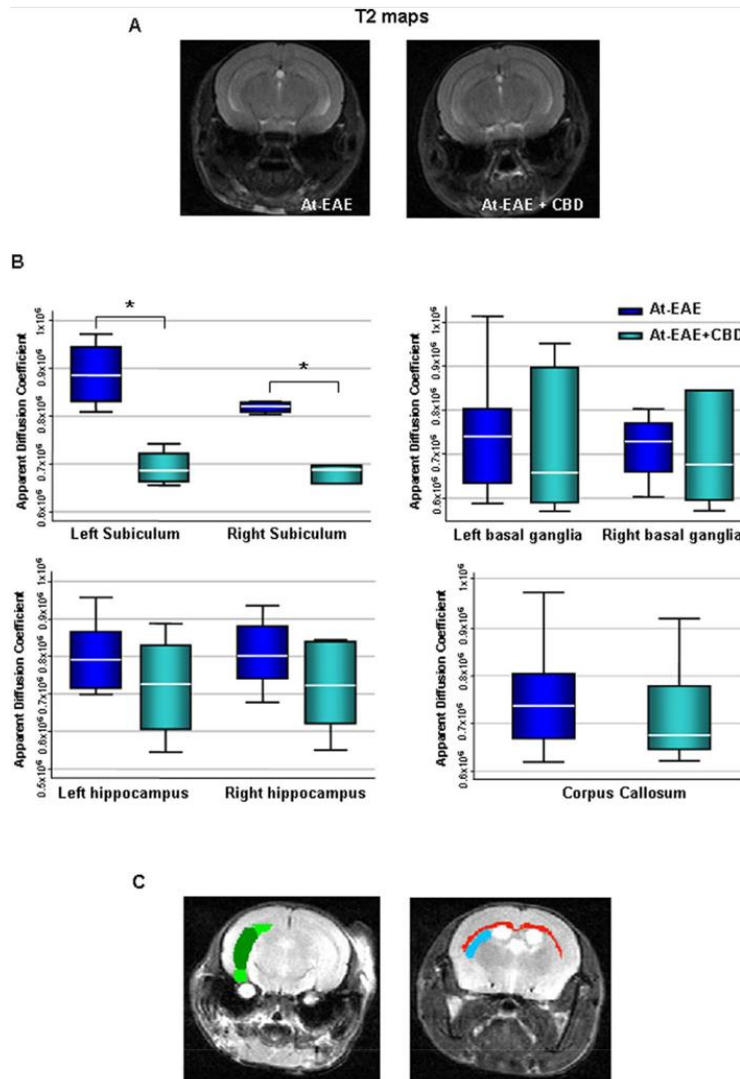


Fig. 2. ADC values display no differences in the ventricular area but significant variation in the ventral subiculum between the at-EAE and at-EAE + CBD groups. MRI measurements were acquired 17 days after disease induction.

(A) T2 maps of a representative mouse brain with untreated at-EAE and one with CBD-treated at-EAE are shown. (B) Quantification of ADC values in the subiculum (dark green), hippocampus (light green), basal ganglia (light blue) and corpus callosum (red). (C) Representative T2-weighted images from slice samples of at-EAE mice show defined regions of interest for ADC histogram analysis. Significant differences in ADC was found in the brain sub-iculum of CBD treated mice compared with the at-EAE group ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  is considered statistically significant. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

indicated concentrations or vehicle for 6 h. After this time, analysis of the cells by focal microscopy revealed a significant increase in ROS at 5 and 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 7D).

As IL-6 is implicated in the recruitment of inflammatory cells, inhibition of T cell apoptosis and activation of the immune system (reviewed in Scheller et al., 2011), we analysed the levels of this cytokine in supernatants from cultures of spleen cells stimulated with MOG<sub>35–55</sub> and IL-12 for 48 h (cultures used in viability assays). This study resulted in a significant increase in secreted IL-6 compared with non-stimulated cells (data not shown). Stimulus-induced IL-6 secretion was significantly inhibited by 5 and 10  $\mu\text{M}$  CBD (Fig. 7E). However, CBD did not affect the levels of IL-6 secreted in the absence of MOG<sub>35–55</sub> and IL-12 stimulation (data not shown).

#### 4. Discussion

Cannabinoids constitute an attractive therapeutic possibility for MS, as they are neuroprotective (Sánchez and García-Merino, 2012; Fernández-Ruiz et al., 2015b), promote remyelination (Arevalo-Martín et al., 2003) and exert a wide array of anti-inflammatory actions (Klein, 2005; Walter and Stella, 2004). CBD reduces the severity of active EAE in parallel with a decrease in inflammatory cytokine expression and microglial activation as well as demyelination, axonal damage and T-cell recruitment in the spinal cord (Kozela et al., 2011; Rahimi et al., 2015). These features underline the therapeutic potential of CBD for the treatment of autoimmune and/or neurodegenerative diseases, such as MS.

In the current study, CBD has been used in at-EAE for the first time and has produced a marked improvement in the disease course. This type of EAE is focused on the effector phase of the disease and allows in

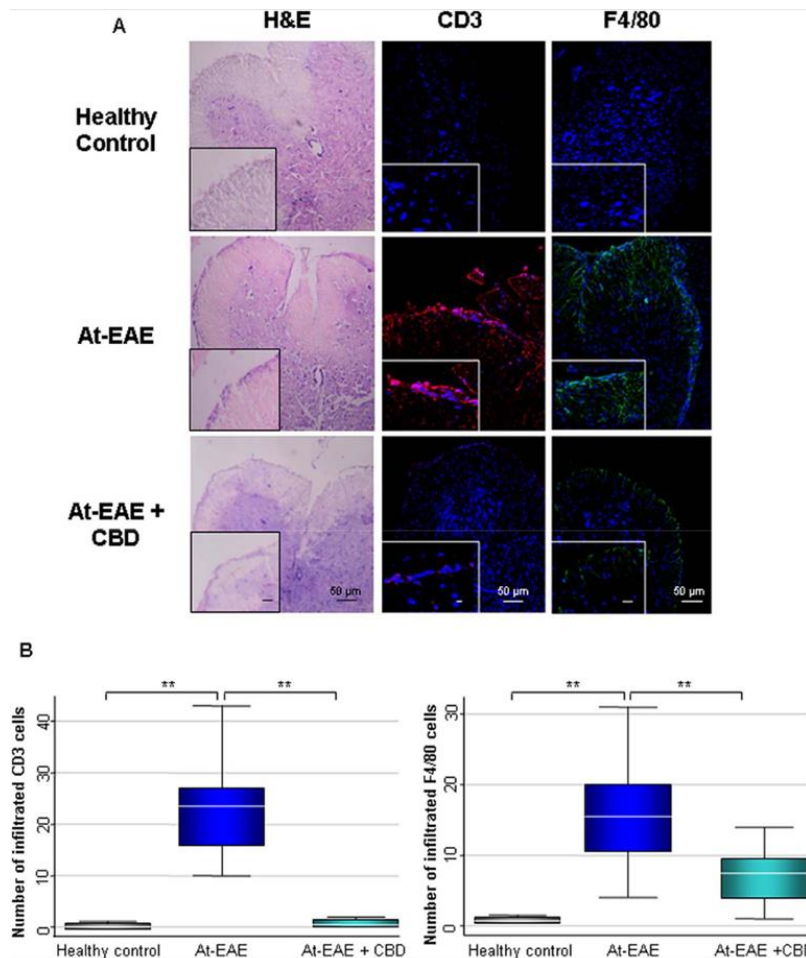


Fig. 3. Inflammatory cell infiltration in the lumbar spinal cord of at-EAE mice is attenuated by CBD. Histopathology of the lumbar spinal cord was carried out in the healthy control, at-EAE and at-EAE + CBD groups of mice. (A) H & E staining showed cell infiltration with meningeal involvement in at-EAE mice but not in healthy controls, and this infiltration was diminished after CBD treatment. Immunostaining with anti-CD3 and anti-F4/80 showed T lymphocytes and macrophages, respectively, in the at-EAE group and a reduction of cell infiltrates after CBD treatment. Bars represent 50  $\mu$ m. (B) Graphs re-present quantification of the number of infiltrated T cells and macrophages. Four areas per mouse and four mice per treatment were measured. Significant differences were  $^{**}p < 0.01$ .

vitro studies to be carried out in encephalitogenic cells. Previous reports have shown a therapeutic benefit of CBD at dose 5 mg kg<sup>-1</sup> in active EAE (Kozela et al., 2011); in our model, this dose was able to reduce clinical signs, but the improvement was more pronounced with 50 mg kg<sup>-1</sup>, with no evidence of toxicity. The efficacy of CBD at this dose range has been reported in animal models of epilepsy (Mao et al., 2015) and even in humans (Bergamaschi et al., 2011), with no significant side effects.

The improvement of clinical signs was in concordance with the MRI findings: we observed a significant reduction in ADC in the subiculum of CBD-treated mice compared with the untreated group. ADC is a quantitative measurement of the ability of water molecules to diffuse through the tissue, and this parameter is related to demyelination and axonal loss in MS (Rovaris et al., 2005; Ingles and Bester, 2011). The subiculum is the most inferior component of the hippocampal formation, which is one of the most sensitive brain zones to neuronal damage, an early event in EAE (Ziehn et al., 2010; Kurkowska-Jastrzebska et al., 2013).

CBD decreases the transmigration of blood leukocytes to the nervous parenchyma in the Theiler's virus model (Mecha et al., 2013). In our model, CBD markedly reduced at-EAE progression, and this change was accompanied by a decrease in T cell and macrophage infiltration,

which has already been reported in other models of MS (Arevalo-Martin et al., 2003). The demyelination and axonal loss found in non-treated EAE mice, as determined by MBP and SMI-32, respectively, were also reduced by CBD, probably due to a restriction of inflammatory cell infiltration in the CNS.

CBD reduces the activation of microglial cells in the Theiler's virus (Mecha et al., 2013) and EAE models (Kozela et al., 2011). Microglia are rapidly activated when the integrity of the CNS is disturbed (Hanisch and Kettenmann, 2007), and this activation includes the re-release of cytotoxic agents and trophic factors, which are critical for the recruitment of peripheral macrophages and lymphocytes to the CNS (Olson and Miller, 2004). Our data showed that CBD treatment causes a decrease in the upregulation of Iba-1 labelling in at-EAE mice.

CB<sub>1</sub> receptor expression is mostly found in neurons, but it can also be detected at low levels in microglia. Berrendero et al., 2001, found that rats with EAE had decreased expression of the CB<sub>1</sub> receptor in the CNS compared with control animals. Furthermore, during active EAE, the expression of the CB<sub>1</sub> receptor in spinal cord is reduced post immunization (Lou et al., 2012). For the first time, we have shown that the CB<sub>1</sub> receptor is downregulated in parallel with a significant disability in at-EAE. Activation of microglia/macrophages reduces CB<sub>1</sub> expression in the CNS (Carlisle et al., 2002); this fact together with the damage and

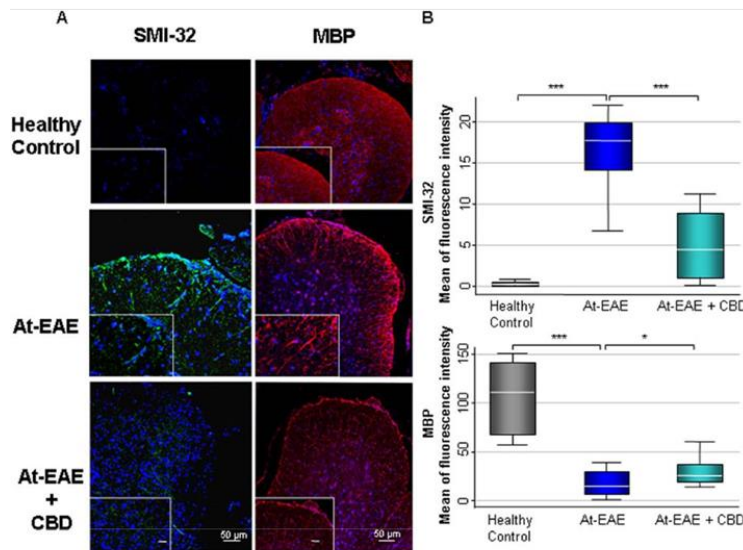


Fig. 4. Axonal damage and demyelination caused by at-EAE induction was diminished by CBD. Lumbar spinal cord sections from healthy control, at-EAE and at-EAE + CBD mice are shown. (A) Immunostaining for non-phosphorylated neurofilaments (SMI-32) showed axonal damage in the untreated at-EAE mice that was prevented by CBD. Myelin basic protein (MBP) labelling shows demyelination in at-EAE, which was reversed in part after CBD treatment. Pictures illustrate a representative section from each group. Bars represent 50  $\mu$ m. (B) Graphs represent the mean of SMI-32 or MBP fluorescence intensity from 4 different zones of spinal fragments. Four mice were included from each experimental group. Differences with \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  were considered statistically significant.

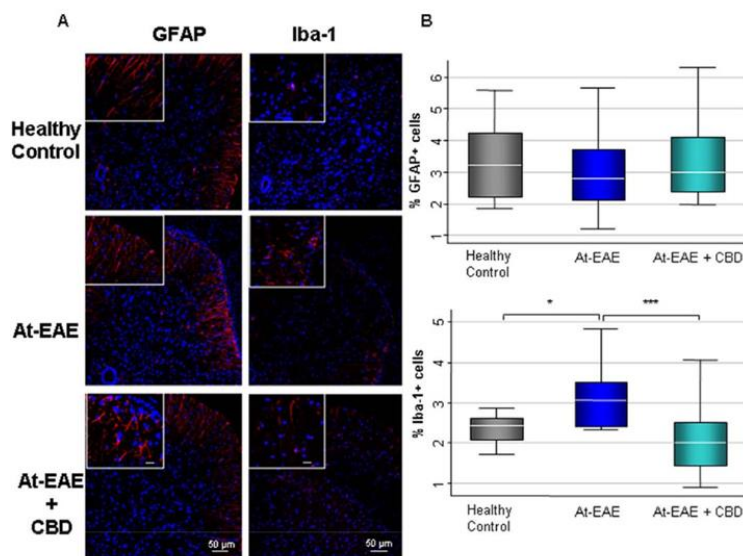


Fig. 5. CBD reduces microglial upregulation labelling. Representative pictures of each group are presented showing GFAP and Iba-1, which are markers for astrocytes and microglia, respectively. (A) GFAP expression was not modified after at-EAE induction or after CBD treatment. Iba-1 was increased in at-EAE mice; CBD induced a significant reduction. Bars represent 50  $\mu$ m. (B) Mean percentage of Iba-1- or GFAP-positive cells from healthy controls and at-EAE mice (4 sections) with and without preventive CBD treatment is represented in the graphs ( $n = 4$  mice). Significant differences were \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

loss of the neuronal cells expressing this receptor, could be a determining factor involved in the observed decrease of CB<sub>1</sub> receptor level in at-EAE. Although CBD was not able to restore significantly the low levels of CB<sub>1</sub> in at-EAE, we found a slight increase of in the levels this receptor, possibly related to the protective effect of CBD on neurons and axons and to decreased microglial activation.

The CB<sub>2</sub> receptor seems not to be expressed in healthy brains, but it can be expressed at relatively high levels by microglia, depending on the activation state of these cells (reviewed in Cabral et al., 2008; Sánchez and García-Merino, 2012). In several neurodegenerative diseases including MS, upregulation of the CB<sub>2</sub> receptor in microglia has been observed (Benito et al., 2007). These data are in agreement with our present results; the CB<sub>2</sub> receptor was found at very low levels in

spinal cords from healthy controls, while at-EAE induction produced a significant elevation, probably due to inflammatory cell infiltration and augmented microglia reactivity.

Although the main receptor targets for endocannabinoids are CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors (Pertwee, 2010), both endocannabinoids and phytocannabinoids may stimulate other receptors such as GPR55. Although the role of GPR55 in EAE is not clearly established, it can be patho-genetically relevant, as GPR55 knockout mice developed less severe EAE than wild-type controls following active induction with MOG<sub>35–55</sub> peptide.

In microglia, LPS and interferon gamma differentially regulate GPR55 mRNA, and this change in expression parallels that of CB<sub>2</sub> mRNA (Pietri et al., 2009), which suggests that GPR55 and CB<sub>2</sub>



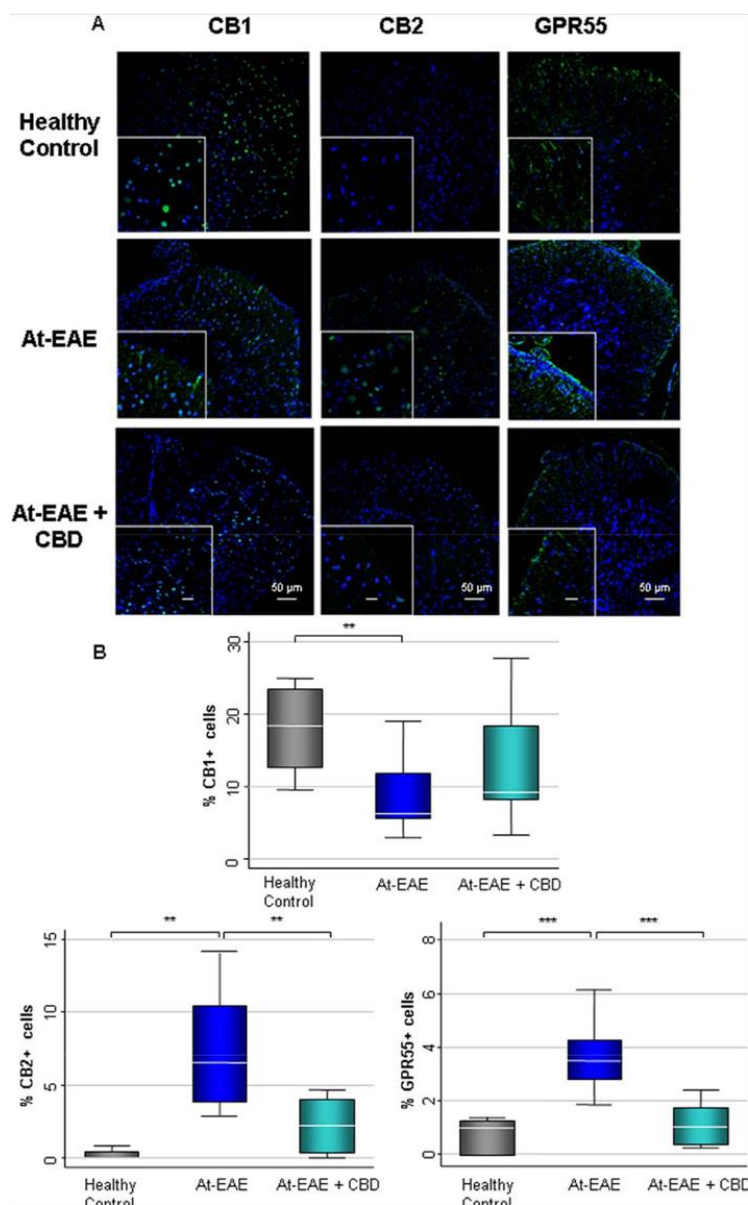


Fig. 6. Spinal cord expression levels of CB2 and GPR55, but not CB1 receptors, were modified by CBD. (A) Lumbar sections were immunostained with TO-PRO for nuclei and with anti-CB1, anti-CB2 or anti-GPR55 antibodies. Bars represent 50  $\mu$ m. (B) High levels of CB1 were expressed in healthy controls, while CBD did not reverse the decrease in the receptor levels found in at-EAE. Healthy mice had low levels of CB2; however, CB2 expression was increased in at-EAE, and this increase was reduced by CBD. Compared with healthy controls, GPR55 protein expression was increased in at-EAE, and this was diminished after CBD treatment. Graphs represent the percentage of CB1-, CB2- or GPR55-positive cells; the analysis was performed in four different areas per section of each mouse ( $n = 4$  mice). Differences with \*\* $p < 0.01$  or \*\*\* $p < 0.001$  were considered statistically significant.

expression might be concomitantly regulated. Our results showed slight expression of the GPR55 receptor in spinal cord of healthy mice, which was increased after EAE induction and restored by CBD treatment; similar results were found for CB<sub>2</sub> expression, suggesting parallel regulation of the two receptors.

Several studies in disease models have shown that CBs can exert their immunosuppressive properties in four main ways: apoptosis, inhibition of cell proliferation, inhibition of cytokine production and induction of regulatory T cells (Rieder et al., 2010). The majority of these investigations have been performed in autoreactive T cells (Kozela et al., 2011) or wild-type spleen cells (Wu et al., 2010), but CBD has not

previously been studied in encephalitogenic spleen cells. In the present study, we showed a marked reduction in the viability of encephalitogenic cells isolated from mice with active EAE, reactivated with MOG<sub>35–55</sub> and IL-12 and incubated with CBD. This effect of CBD is a possible contributing factor in the amelioration of the signs of at-EAE. In our hands, consistent with the findings of Kozela et al., 2011, this reduction in cell viability was not mediated by CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors. GPR55 was also implicated in reducing the viability of encephalitogenic cells despite the fact that it is involved in the proliferation of some cell types (Hu et al., 2011). There is also the possibility that other receptors such as PPAR $\gamma$  or TRPV1, two suggested targets for CBD, might have

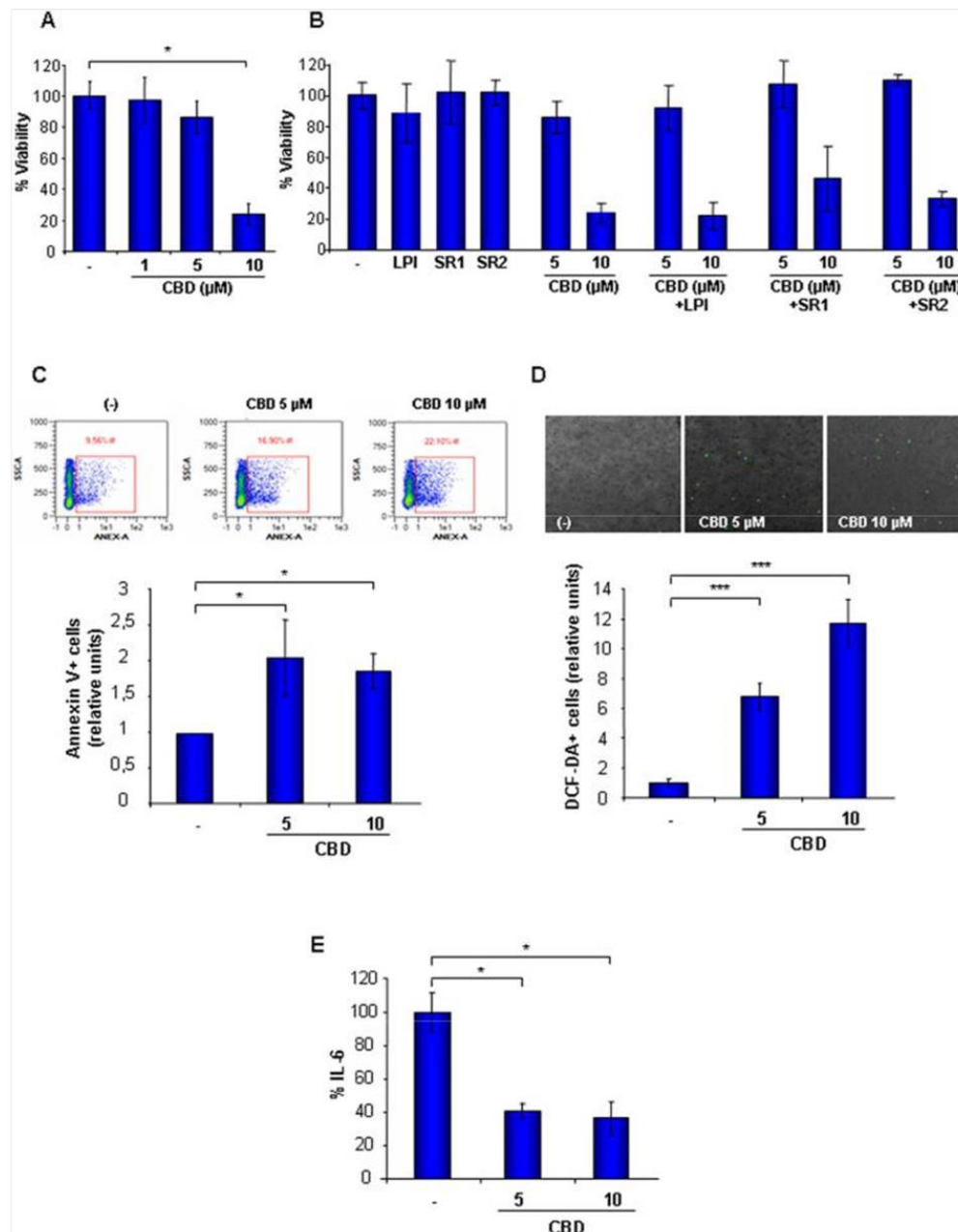


Fig. 7. CBD reduced the viability of encephalitogenic spleen cells independently of GPR55, CB1 and CB2 receptors, increased apoptosis by inducing ROS production and reduced IL-6 production. (A) An MTT assay showed a decrease in the viability of spleen cells isolated from EAE mice and treated with different concentrations of CBD (μM). (B) Neither CB1 and CB2 antagonists (SR1 and SR2, 1 μM) nor a GPR55 agonist (LPI, 1 μM) restored normal viability in 10 μM CBD cultures at 48 h. (C) Relative early apoptosis increased in encephalitogenic spleen cells incubated with 5 and 10 μM CBD. Flow cytometry analysis was performed after 24 h of activation with annexin V. The upper panel shows cytometry plots, and the bottom graph shows relative units of early apoptosis in encephalitogenic cells. (D) Confocal microscopy showed increased ROS in encephalitogenic cells preloaded with DCF-DA and incubated with CBD (5 and 10 μM) or vehicle for 6 h. The upper panel presents microscopy pictures showing DCF-DA-positive cells at different CBD concentrations. Bars represent 50 μm. The bottom panel shows quantification of the DCF-DA-positive cells. (E) IL-6 secretion was measured by ELISA in cell-free medium from proliferation assays and was reduced by CBD at the indicated concentrations. Viability and ELISA assays correspond to three experiments, each with triplicate samples, where activated spleen cells without CBD treatment are set as 100%. The annexin V graph represents the mean ± SD of four independent experiments. The DCF-DA graph represents the mean of two experiments with quadruplicate samples. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 were considered statistically significant.



some role (Fasino et al., 2016).

The reduced viability of the encephalitogenic cells, mediated by CBD, could be due to the augmented early apoptosis that we found in our cell cultures, an observation also reported in primary immune cells by Rieder et al., 2010. Oxidative stress is a mechanism that could be associated with this CBD-mediated apoptosis (Wu et al., 2008), since there is ample evidence of a crucial role of ROS in the regulation of apoptosis (Haddad, 2004). The positive association between early apoptosis and enhanced ROS production in our cell cultures suggests that CBD induces apoptosis of encephalitogenic cells through oxidative stress induction.

IL-6 is a pleiotropic cytokine with complex pro- and anti-inflammatory properties as well as many other non-immune functions (Erta et al., 2012). IL-6 and other members of its cytokine family play essential roles in modulating the immune response with various effects on T cells, B cells and dendritic cells. In MS, IL-6 has a central role in regulating the immune response (Janssens et al., 2015); in EAE, IL-6-deficient mice are resistant to disease induction (Eugster et al., 1998). Considering the pronounced antiapoptotic effect of IL-6 on T cells (Scheller et al., 2011), the observed IL-6 reduction mediated by CBD in our encephalitogenic spleen cell cultures could favour an increase of apoptosis and a reduction in the viability of these cells. This might be a contributing factor in the therapeutic effect of CBD against EAE.

In summary, CBD administered daily at 50 mg kg<sup>-1</sup> to at-EAE mice, before the onset of disease, reduced the severity of the clinical signs and improved MRI findings. Furthermore, CBD treatment was accompanied by diminished axonal loss and inflammation (infiltration of T cells and macrophages and microglial activation). It also reduced CB<sub>2</sub> and GPR55 receptor levels in the CNS. Despite the clearly existing limitations of having explored CBD only as a preventive treatment, all these findings, along with the increased in vitro apoptosis of encephalitogenic cells, may support the possibility that CBD could have a role in the therapy against MS. However, further studies should be performed to evaluate the potential of CBD as a candidate drug for treating MS.

#### Authors' contributions

CGG: experimental design, data acquisition, interpretation of data, drafting the work.

IMT, RGH, LCR, LRE, MJCA, AGG: data acquisition, analysis and interpretation of data.

AJSL and AGM: study design, drafting and critical revision of re-usults.

All authors agreed with the contents of this manuscript.

#### Conflicts of interest

None declared.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to GW Pharmaceuticals (Salisbury, Wiltshire, UK) for kindly providing CBD for the present study.

We are also indebted to Ana Royuela for her help with statistical analysis and to Alicia Sánchez Sanz for helpful discussion.

This work was supported by grants from the Carlos III Research Institute (ISCIII) and the State Plan for Scientific and Technical Research and Innovation (2008–2011 and 2013–2016), with co-funding from the European Regional Development Fund (FEDER) (Grant Numbers: PI12/02672 and PI15/02099).

#### References

- Amor, S., O'Neill, J.K., Morris, M.M., Smith, R.M., Wraith, D.C., Groome, N., Travers, P.J., Baker, D., 1996. Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein, proteolipid protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein for experimental allergic

- encephalomyelitis induction in Biozzi ABH (H-2Ag7) mice share an amino acid motif. *J. Immunol.* 156, 3000–3008.
- Arevalo-Martin, A., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Borrell, J., Guaza, C., 2003. Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 23, 2511–2516 (doi:23/7/2511 [pii]).
- Badea, A., Ali-Sharief, A.A., Johnson, G.A., 2007. Morphometric analysis of the C57BL/6J mouse brain. *NeuroImage* 37, 683–693. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.05.046>.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T., Di Marzo, V., 2001. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* 15, 300–302. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.00-0399jfe>.
- Benito, C., Romero, J.P., Tolón, R.M., Clemente, D., Docagne, F., Hillard, C.J., Guaza, C., Romero, J., 2007. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydro-lase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 27, 2396–2402. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4814-06.2007>.
- Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., 2011. Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr. Drug Saf.* 6, 237–249.
- Berrendero, F., Sánchez, A., Cabranes, A., Puerta, C., Ramos, J.A., García-Merino, A., Fernández-Ruiz, J., 2001. Changes in cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse* 41, 195–202. <http://dx.doi.org/10.1002/syn.1075>.
- Cabral, G.A., Raborn, E.S., Griñón, L., Dennis, J., Marciano-Cabral, F., 2008. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br. J. Pharmacol.* 153, 240–251. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707584>.
- Carlisle, S.J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., Cabral, G.A., 2002. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int. Immunopharmacol.* 2, 69–82.
- Consolet-Bram, L., Marcu, J., Abood, M.E., 2012. Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 38, 4–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.02.009>.
- Erta, M., Quintana, A., Hidalgo, J., 2012. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1254–1266. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.4679>.
- Eugster, H., Frei, K., Kopf, M., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H., Fontana, A., 1998. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 28, 2178–2187. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199807\)28](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28).
- Fasino, P.S., Phillips, S., ElSohly, M.A., Walker, L.A., 2016. Current status and prospects for cannabidiol preparations as new therapeutic agents. *Pharmacotherapy* 36, 781–796. <http://dx.doi.org/10.1002/phar.1780>.
- Fernández-Ruiz, J., Pazos, M.R., García-Arencibia, M., Sagredo, O., Ramos, J.A., 2008. Role of CB<sub>2</sub> receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, 91–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.001>.
- Fernández-Ruiz, J., Moro, M.A., Martínez-Orgado, J., 2015a. Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke-brain trauma: from preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics* 12, 793–806. <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-015-0381-7>.
- Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Ramos, J.A., 2015b. Endocannabinoids and neurodegenerative disorders: Parkinson's disease, Huntington's chorea, Alzheimer's disease, and others. *Handb. Exp. Pharmacol.* 231, 233–259. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_8).
- Haddad, J.J., 2004. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmacological conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int. Immunopharmacol.* 4, 475–493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2004.02.002>.
- Hammell, D.C., Zhang, L.P., Ma, F., Abshire, S.M., McIlwraith, S.L., Stinchcomb, A.L., Westlund, K.N., 2015. Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *Eur. J. Pain.* <http://dx.doi.org/10.1002/ejp.818>.
- Hanisch, U.-K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1997>.
- Hu, G., Ren, G., Shi, Y., 2011. The putative cannabinoid receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation. *Oncogene* 30, 139–141. <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2010.502>.
- Ibeas Bih, C., Chen, T., Nunn, A.V.W., Bazelot, M., Dallas, M., Whalley, B.J., 2015. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics* 12, 699–730. <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-015-0377-3>.
- Inglese, M., Bester, M., 2011. Diffusion imaging in multiple sclerosis: research and clinical implications. *NMR Biomed.* 23, 865–872. <http://dx.doi.org/10.1002/nbm.1515>.
- Janssens, K., Slaets, H., Hellings, N., 2015. Immunomodulatory properties of the IL-6 cytokine family in multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1351, 52–60. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12821>.
- Kilkeny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1577–1579. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>.
- Klein, T.W., 2005. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 400–411. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1602>.
- Klein, T.W., Newton, C.A., 2007. Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 601, 395–413.
- Kozela, E., Lev, N., Kaushansky, N., Eilam, R., Rimmelman, N., Levy, R., Ben-Nun, A., Julmat, A., Vogel, Z., 2011. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1507–1519. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.2011.163>.

- Kuchroo, V.K., Sobel, R.A., Laning, J.C., Martin, C.A., Greenfield, E., Dorf, M.E., Lees, M.B., 1992. Experimental allergic encephalomyelitis mediated by cloned T cells specific for a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. Fine specificity and T cell receptor V $\beta$  usage. *J. Immunol.* 148, 3776–3782.
- Kurkowska-Jastrzebska, I., Świątkiewicz, M., Zaremba, M., Cudna, A., Piechal, A., Pyrzanowska, J., Widy-Tyszkiewicz, E., Członkowska, A., 2013. Neurodegeneration and inflammation in hippocampus in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in rats by one-time administration of encephalitogenic T cells. *Neuroscience* 248, 690–698. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.025>.
- Lee, C.-Y., Wey, S.-P., Liao, M.-H., Hsu, W.-L., Wu, H.-Y., Jan, T.-R., 2008. A comparative study on cannabidiol-induced apoptosis in murine thymocytes and EL-4 thymoma cells. *Int. Immunopharmacol.* 8, 732–740. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.018>.
- Lee, W.-S., Erdelyi, K., Matyas, C., Mukhopadhyay, P., Varga, Z.V., Liaudet, L., Haskó, G., Ciháková, D., Mechoulam, R., Pacher, P., 2016. Cannabidiol limits T cell-mediated chronic autoimmune myocarditis: implications for autoimmune disorders and organ transplantation. *Mol. Med.* <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2016.00007>.
- Lou, Z.-Y., Zhao, C.-B., Xiao, B.-G., 2012. Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by the selective CB1 receptor antagonist J. *Neurosci. Res.* 90, 84–95. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22721>.
- Mao, K., You, C., Lei, D., Zhang, H., 2015. High dosage of cannabidiol (CBD) alleviates pentylenetetrazole-induced epilepsy in rats by exerting an anticonvulsive effect. *Epilepsia* 56, 8820–8827.
- McGrath, J., Drummond, G., McLachlan, E., Kilkeny, C., Wainwright, C., 2010. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1573–1576. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00873.x>.
- McKallip, R.J., Jia, W., Schlomer, J., Warren, J.W., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M., 2006. Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: a novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol. Pharmacol.* 70.
- Mecha, M., Felú, A., Iñigo, P.M., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F.J., Guaza, C., 2013. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. *Neurobiol. Dis.* 59, 141–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.016>.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., Ben-Nun, A., 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V $\beta$  expression of encephalitogenic T cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 1951–1959. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830250723>.
- Moreno Torres, I., Sanchez, A.J., Garcia-Merino, A., 2014. Evaluation of the tolerability and efficacy of Sativex in multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.* 14 (11), 1243–1250. <http://dx.doi.org/10.1586/14737175.2014.971758>. (Nov).
- Olson, J.K., Miller, S.D., 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3916>.
- Pertwee, R.G., 2010. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Med. Chem.* 17, 1360–1381.
- Pietr, M., Kozela, E., Levy, R., Rimmerman, N., Lin, Y.H., Stella, N., Vogel, Z., Juknat, A., 2009. Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett.* 583, 2071–2076. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.028>.
- Prat, A., Antel, J., 2005. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 18, 225–230.
- Pryce, G., Baker, D., 2015. Endocannabinoids in multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 231, 213–231. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_7).
- Pryce, G., Ahmed, Z., Hankey, D.J.R., Jackson, S.J., Croxford, J.L., Pocock, J.M., Ledent, C., Petzold, A., Thompson, A.J., Giovannoni, G., Cuzner, M.L., Baker, D., 2003. Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* 126, 2191–2202. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awg224>.
- Rahimi, A., Faizi, M., Talebi, F., Noorbakhsh, F., Kahni, F., Naderi, N., 2015. Interaction between the protective effects of cannabidiol and palmitoylethanolamide in experimental model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice. *Neuroscience* 290, 279–287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.030>.
- Ribeiro, A., Almeida, V.I., Costola-de-Souza, C., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Vitoretti, L.B., Gimenes-Junior, J.A., Akamine, A.T., Crippa, J.A., Tavares-de-Lima, W., Palermo-Neto, J., 2015. Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 37, 35–41. <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2014.976794>.
- Rieder, S.A., Chauhan, A., Singh, U., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., 2010. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* 215, 598–605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2009.04.001>.
- Ross, R.A., 2009. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 156–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2008.12.004>.
- Rovaris, M., Gass, A., Bammer, R., Hickman, S.J., Ciccarelli, O., Miller, D.H., Filippi, M., 2005. Diffusion MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 65, 1526–1532. <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000184471.83948.e0>.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hemmanson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., 2009. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 152, 1092–1101. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>.
- Sánchez, A.J., García-Merino, A., 2012. Neuroprotective agents: cannabinoids. *Clin. Immunol.* 142, 57–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2011.02.010>.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1813, 878–888. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>.
- Seehusen, F., Baumgärtner, W., 2010. Axonal pathology and loss precede demyelination and accompany chronic lesions in a spontaneously occurring animal model of multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 20, 551–559. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00332.x>.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683–747. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707>.
- Ullmann, J.F.P., Watson, C., Janke, A.L., Kurniawan, N.D., Reutens, D.C., 2013. A segmentation protocol and MRI atlas of the C57BL/6J mouse neocortex. *NeuroImage* 78, 196–203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.04.008>.
- Walter, L., Stella, N., 2004. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol.* 141, 775–785. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705667>.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C., 1994. Animal models. *Ann. Neurol. (Suppl. 36)*, S47–53.
- Wu, H.-Y., Chai, R.M., Wang, C.-C., Lee, C.-Y., Lin, S.H., Jan, T.-R., 2008. Cannabidiol-induced apoptosis in primary lymphocytes is associated with oxidative stress-dependent activation of caspase-8. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2007.09.012>.
- Wu, H.-Y., Chang, A.-C., Wang, C.-C., Kuo, F.-H., Lee, C.-Y., Liu, D.-Z., Jan, T.-R., 2010. Cannabidiol induced a contrasting pro-apoptotic effect between freshly isolated and precultured human monocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 141–147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2010.05.003>.
- Zamvil, S.S., Mitchell, D.J., Moore, A.C., Kitamura, K., Steinman, L., Rothbard, J.B., 1986. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* 324, 258–260. <http://dx.doi.org/10.1038/324258a0>.
- Ziehn, M.O., Avedisian, A.A., Tiwari-Woodru, S., Voskuhl, R.R., 2010. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. *Lab. Invest.* 90, 774–786. <http://dx.doi.org/10.1038/abinvest.2010.6>.





# IL-18 improves the activation of encephalitogenic cells and the induction of adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis.

Ruth García-Hernández<sup>1,2</sup>, Irene Moreno Torres<sup>1,2</sup>, Aranzazu García-Grande<sup>1</sup>, María José Coronado Albi<sup>1</sup>, Alicia Sánchez Sanz<sup>1</sup>, Antonio García-Merino<sup>1,2,3,4</sup> and Antonio J. Sánchez-López<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Biomedical Research Institute of Puerta de Hierro University Hospital, Madrid, Spain; <sup>2</sup> Universidad Autónoma de Madrid, Spain; <sup>3</sup> Puerta de Hierro University Hospital, Madrid, Spain; <sup>4</sup> The Spanish network of multiple sclerosis REEM.



## INTRODUCTION AND PURPOSE

Adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis (at-EAE) is an animal model that allows for a better delineation of the effector phase of EAE, regardless of the inducer. There is no consensus about an ideal protocol in the existing literature. In order to develop a more reliable and consistent animal model of at-EAE, encephalitogenic cells were tested *in vitro* to study different conditions of stimulation before they were transferred to recipient animals.

## METHODS

### Encephalitogenic cells

Splenocytes and lymph nodes from C57BL/6 mice with actively induced EAE were cultured in different conditions with MOG<sub>35-55</sub> (25 or 50 µg/ml), IL-12 (25 ng/ml) and with or without IL-18 (25 ng/ml) at 60, 72 and 96 hours.

Differential activation of the encephalitogenic cells was studied by detecting by flow cytometry the following markers: CD69, IL-2 and IFN-γ.

### At-EAE induction

An *in vivo* experiment was conducted in C57BL/6 mice, using the two experimental conditions that produced more cell activation. The lymph nodes and spleen cells were transferred (20 × 10<sup>6</sup> cells) intraperitoneally (i.p.) to naive mice.

### Neurological assessment

Mice were examined daily to record behavioral and neurological signs during 58 days after immunization. On day 58, spinal cords were collected for further pathological and expression studies.

Disease score was evaluated as follows: 0, asymptomatic; 1, partial loss of tail tonicity or soft weakness in hind limbs; 2, tail paralysis or mild weakness in hind limbs; 3, hind limb weakness or ataxia; 4, partial hind limb paralysis and ataxia; 5, total hind limb paralysis; 6, moribund.

### Histology

Perfused, intact spinal columns were removed from two different groups of mice after adoptive transfer of MOG<sub>35-55</sub>-specific T cells treated with IL-12 and with or without IL-18. Cell infiltration, axonal loss, demyelination, and cannabinoid receptor expression (CB1, CB2 and GPR55) were analyzed *ex vivo* by confocal microscopy in lumbar spinal cords.

For immunofluorescence, the following antibodies were used in 8 µm cryosections: anti-CD3 (Abcam; 1:20) for T cell infiltration; anti-CD45R (Anti-Rat/150) for B cell infiltration; F4/80 (Abcam 8MB clone) for macrophage infiltration; SMI-32 (Abcam; 1:1000) for non-phosphorylated neurofilaments; anti-MBP (Abcam; 1:100) for myelin basic protein; anti-GFAP (Sigma; 1:800) for astrocytes; anti-Iba-1 (Abcam; 1:200) for microglia; anti-GPR55 (Abcam; 1:50) for GPR55 receptors; anti-CB1 (Abcam; 1:50) for CB1 receptor; anti-CB2 (Abcam; 1:50) for CB2 receptor. TO-PRO (Invitrogen; 1:1000) was used to visualize the cellular nuclei. Confocal microscopy analysis was performed with a Leica TCS SP5 microscope (Wetzlar, Germany) acquiring images through the LAS AF program (Leica).

### Statistical analysis

Clinical scores were presented as the mean ± SEM. Differences between groups were analysed using Wald Chi-Square test. \* P < 0.05 was considered statistically significant. Chi Square test for post-hoc analyses were performed for *ex vivo* and *in vitro* assays. The significance level was set at 0.05.

\*\*P < 0.01

## RESULTS

First, a study was carried out to see whether the culture duration influenced cell activation. Before inoculation to the female mice C57BL/6, we assured that the cells had differentiated to Th1 by quantifying the amount of IL-2, IFN-γ and CD69 by flow cytometry. It was shown that the longer the time, the more activation (Figure 1A). In addition, a percentage of cells began to change in parameters of FSC size and SSC complexity within time. This new population that differentiates with time agrees with activated profile (Figure 1B).

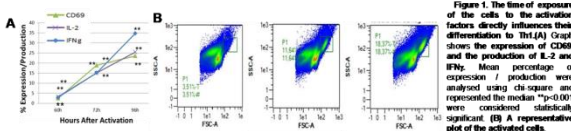


Figure 1. The time of exposure of the cells to the activation factors directly influences their differentiation to Th1 (A). Graph shows the expression of CD69, and the production of IL-2 and IFN-γ. Mean percentage of expression / production were analysed using chi square and represented the median. \*\*P < 0.01 were considered statistically significant. (B) A representative plot of the activated cells.

Afterwards, different combinations of stimuli were studied: MOG<sub>35-55</sub> (25 or 50 µg/ml), IL-12 (25 ng/ml) and with or without IL-18 (25 ng/ml) at 60, 72 and 96 hours. Measurement of cytokines was performed by flow cytometry. We discarded the 50 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> dose as it produced considerable cell death. The best combination was 25 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> + 25 ng/ml IL-12 + 25 ng/ml IL-18, as in the absence of IL-18, the production of IFN-γ was reduced, although the percentages of CD69 and IL-2 were similar in both conditions (Figure 2). When using IL-18 the production of IFN-γ increases significantly to 72h. These conditions were selected for *in vivo* experiments (Figure 3).

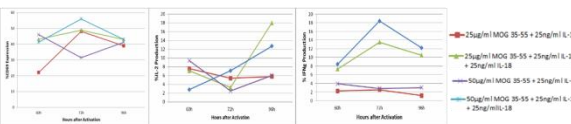


Figure 2. Cellular activation measured by CD69 expression and percentage of IL-2 and IFN-γ producing cells at different exposure times and differential activation. (A) Percentage of CD69+ cells. (B) Percentage of IL-12 production. (C) Percentage of IFN-γ production.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants Fondo de Investigación Sanitaria FISPI202672 and PI15/02099 integrated in the Plan Nacional de I+D+I (2008-2011 and 2013-2016 respectively), supported by the ISCIII-subdirección General de Evaluación and co-financed by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and from Novartis (PI110/13 JGM-INM2014-01). It was also supported by Genzyme Pharma (Project: 23379).

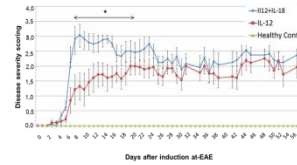


Figure 3. IL-12 and IL-18 regulate the encephalitogenicity of MOG<sub>35-55</sub>-specific T cells. IL-12 treated MOG<sub>35-55</sub>-specific T cells transferred less severe EAE as expressed by lower peak and less incidence than MOG<sub>35-55</sub>-specific T cells treated with both IL-12 and IL-18. MOG<sub>35-55</sub>-specific T cells (20 × 10<sup>6</sup> cells/mouse) that were treated with IL-12, or the combination of IL-12 and IL-18 were transferred i.p. to C57BL/6 mice. The data are expressed as the mean clinical score for all animals as a function of days after transfer of MOG<sub>35-55</sub>-specific T cells. Each group represents the mean of 5 mice for control, 7 at EAE IL-12 treated and 6 at EAE IL-12 and IL-18 treated. Values of \* p < 0.05 and were considered statistically significant. Disease score was presented as the mean ± SEM.

Immunostaining of the lumbar area sections showed an increased signal of CD3, CD45R, F4/80 and SMI-32 and less signal of MBP in the IL-12+IL-18 group than in the IL-12 treated mice. This indicates that infiltration, axonal damage and demyelination increases in spinal cord of at-EAE IL-12 and IL-18 treated mice compared to controls and IL-12 treated (Figure 4). Also, determination of CB1, CB2 or GPR55 receptors was measured by confocal microscopy. We found a higher expression of CB2 and a lower expression of CB1 in the IL-12+IL-18 group than in the IL-12 treated mice (Figure 5).

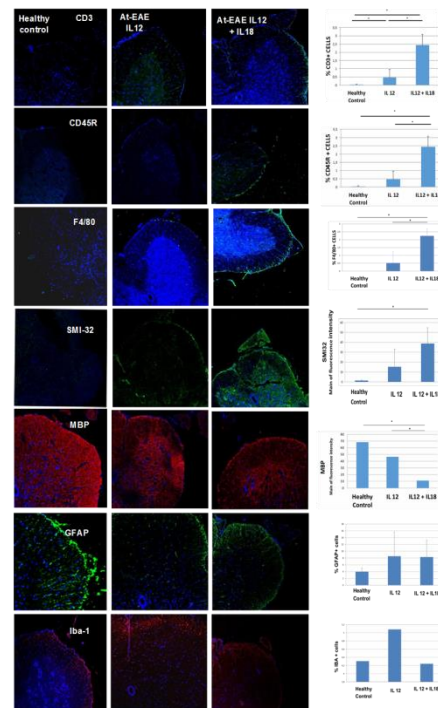


Figure 4. IL-18 increases infiltration, axonal damage and demyelination. Immunofluorescence images of the lumbar spinal cord sections from healthy mice, at-EAE mice IL-12 treated, and at-EAE mice IL-12+IL-18 treated at day 58 post inoculation. To-Pro (Blue) nuclei; CD3: T lymphocytes; CD45R: B lymphocytes; F4/80: Macrophages; SMI-32: non-phosphorylated neurofilaments; MBP: myelin basic protein; GFAP: astrocytes and Iba-1: Microglia. Representative images (20x) from each group are shown.

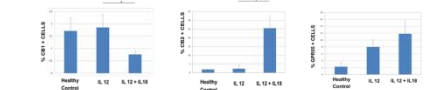


Figure 5. IL-18 increase expression of CB2 and reduce expression of CB1.

## CONCLUSIONS

- An optimal boosting of encephalitogenic cells *in vitro* was achieved with the combination of IL-12 and IL-18, which induced a significant secretion of IFN-γ.
- The best balance between cell activation/death was achieved at 72 hours of culture.
- The IL-12+IL-18 at-EAE treated mice presented higher infiltration, axonal damage and demyelination than the IL-12 group. We also found a higher expression of CB2 and a lower expression of CB1 in the IL-12+IL-18 group than in the IL-12 treated mice.

## REFERENCES

- J Immunol, Atsushi Ito et Al. 2003, 170 (9):4802-4809
- J Immunol, Fu-Dong Shi et Al. 2000; 165:3099-3104
- Nature Protocols, Ingunn M Strommes & Joan M Goverman, 2006: volume1, pages1952-1960
- Cytokine Growth Factor, Nakanishi K et Al. 2001, 12(1):53-72.



# Influence of cannabidiol on mesenchymal stem cells therapy in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis. An *in vivo* and *in vitro* study.

Coral González-García<sup>1</sup>, Ruth García-Hernández<sup>1,2</sup>, Irene Moreno Torres<sup>1,2</sup>, Lucía Campos Ruiz<sup>1</sup>, María José Coronado<sup>1</sup>, Aranzazu García-Grande<sup>1</sup>, Alicia Sánchez Sanz<sup>1</sup>, Antonio García-Merino<sup>1,2,3,4</sup> and Antonio J Sánchez-López<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Biomedical Research Institute of Puerta de Hierro University Hospital, Madrid, Spain; <sup>2</sup> Autonomous University of Madrid, Spain; <sup>3</sup> Puerta de Hierro University Hospital, Madrid, Spain; <sup>4</sup> The Spanish network of multiple sclerosis REEM.

## INTRODUCTION AND PURPOSE

Mesenchymal stem cells (MSCs) are promising candidates for MS therapy due to their anti-inflammatory and neuroprotective properties. Although there is not much information about the endocannabinoid system in MSCs, it has been described that cannabidiol (CBD), a non-psychotropic cannabinoid, might enhance the therapeutic effect of these cells.

**Purpose:** To explore the influence of CBD in MSCs cultures as well as to test the ability of CBD to improve MSCs therapeutic effect in adoptively transferred EAE (at-EAE). This animal model was selected to study the compound effects on the effector phase of EAE.

## METHODS

### At-EAE induction

Cell of lymph nodes and spleen cells from active EAE-MOG<sub>35-55</sub> C57BL/6 mice were primed 72h with MOG<sub>35-55</sub> (25µg/ml) and IL-12 (25ng/ml) and then transferred (20 x 10<sup>6</sup> cells) intraperitoneally (i.p.) to naive mice.

### Treatment, neurological assessment

Mice were divided into two groups: at-EAE, at-EAE+ MSCs (0.5 x 10<sup>6</sup> cells twice a week). MSCs were isolated from bone marrow of tibias and femur of six weeks C57BL/6J mice.

Mice were examined daily to record behavioral and neurological signs during 23 days after the immunization. Disease scores were assigned as follows: 0, asymptomatic; 1, partial loss of tail tonicity or soft weakness in hind limbs; 2, tail paralysis or mild weakness in hind limbs; 3, hind limb weakness or ataxia; 4, partial hind limb paralysis and ataxia; 5, total hind limb paralysis; 6, moribund. Intact spinal cords were removed from mice on day 23 after disease induction, fixed in paraformaldehyde, embedded in OCT (Tissue-Tek Sakura) and cryosections were prepared for immunostaining.

Additionally, clinical parameters of at-EAE animals treated with MSCs in combination with CBD (50mg/kg/d) were studied. CBD (GW Pharma) solution was prepared following manufacturer's instructions and injected daily i.p.

### Histology

Cell infiltration, axonal loss and demyelination were analyzed *ex vivo* by confocal microscopy in lumbar spinal cords. For immunofluorescence the following antibodies were used: anti-CD3 (Abcam; 1:20) for T cell infiltrates; F4/80 (Abcam 8MB clone) for macrophage infiltrates; SMI-32 (Abcam) for non-phosphorylated neurofilaments; MBP (Abcam) for myelin basic protein; ; Iba-1 (Wako) for microglia.

### CB1, CB2 and GPR55 receptor expression

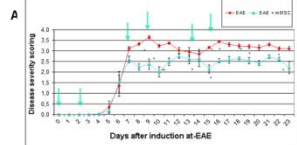
*In vitro*, cannabinoid receptors were determined in MSCs and encephalitogenic cells by confocal microscopy and flow cytometry. Toxicity and cytokine production mediated by CBD in co-cultures of MSCs and encephalitogenic cells were revealed by MTT and ELISA respectively. Influence of CBD on differentiation and migration of MSCs was also evaluated.

### Statistical analysis

Clinical scores were presented as the mean ± SEM. ANOVA followed by Tukey test was used. \* P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 were considered statistically significant. Kruskal Wallis test and Mann-Whitney U test for post-hoc analyses were performed for *ex vivo* and *in vitro* assays. The significance level was set at 0.05. Bonferroni correction was applied in multiple comparisons.

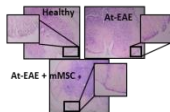
## RESULTS

MSCs injected twice a week induced a significant suppression of clinical signs (Figure 1).



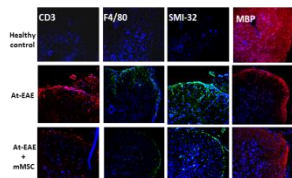
**Figure 1.** MSCs ameliorated the clinical signs of at-EAE mice. Graph shows the clinical score progression of at-EAE and MSCs treatment until day 23. Disease score was represented as the mean ± SEM.

H&E staining of spinal cord lumbar area showed cell infiltration with meningeal involvement in at-EAE mice but not in healthy controls, and this infiltration was diminished after mMSC treatment (Figure 2).



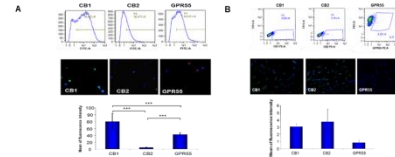
**Figure 2.** Representative image of H&E staining in 3 µm sections of the lumbar region of mice: healthy, at-EAE, at-EAE + mMSC and EAE.

Immunostaining of the lumbar area sections showed an increased signal of CD3, F4/80, SMI-32 and a decrease of MBP in at-EAE mice, compared to controls. In the group treated with MSCs there was a decrease in the number of macrophages and a reduction in axonal damage. Nevertheless, macrophage infiltration and MBP expression were not modified after MSCs treatment (Figure 3).



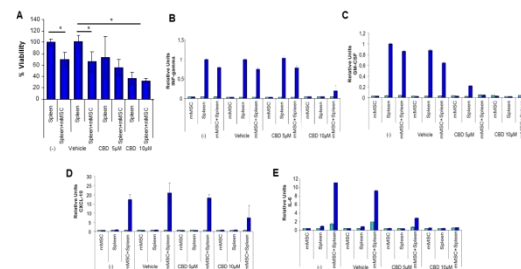
**Figure 3.** MSCs treatment reduced macrophages infiltration and axonal damage but no significant changes were observed in lymphocyte infiltration and MBP expression. Immunohistochemical images of the lumbar spinal cord sections from healthy mice, at-EAE mice, and at-EAE MSCs treatment at day 23 post-mortem. To-Pro (Blue) nuclei, CD3: T lymphocytes; F4/80: Macrophages; SMI-32: non-phosphorylated neurofilaments and MBP: myelin basic protein. Representative images (20x) from a mouse of each group are shown.

CB1, CB2 and GPR55 receptors expression analysis revealed a scarce surface expression in MSCs compared to encephalitogenic cells (Figure 4).



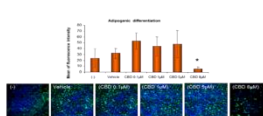
**Figure 4.** Characterization of CB1, CB2 and GPR55 receptors in encephalitogenic cells (A) and MSCs (B) by flow cytometry and by confocal microscopy.

MSCs and encephalitogenic cell co-cultures, showed a reduced viability of encephalitogenic. Production of cytokines was measured by ELISA (Figure 5).



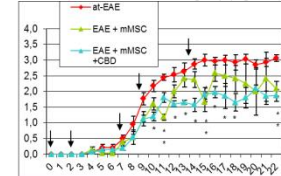
**Figure 5.** CBD cytotoxicity in the co-culture of encephalitogenic spleen cells with mMSC. Statistical analysis performed using the Kruskal Wallis test and later Bonferroni correction. Values \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 are considered statistically significant. Production of (B) IFN-γ, (C) GM-CSF, (D) CXCL-10 and (E) IL-6.

Addition of CBD in co-cultures resulted in a decrease of IL-6 production and adipogenic differentiation, whereas migratory capacity was not modified in MSCs (Figure 6).



**Figure 6.** Effect of CBD on Adipogenic differentiation of MSCs. Culture of mesenchymal cells incubated with CBD for 5 days. Determination by staining with FABP anti-mouse. Statistical analysis performed using the Kruskal Wallis test and later Bonferroni correction. Values \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 were considered statistically significant.

CBD concomitant treatment with MSCs cells caused a higher trend to diminished clinical signs in at-EAE compared to MSCs-treated group (Figure 7).



**Figure 7.** Clinical signs in at-EAE and treatments with MSCs and the combination of CBD and MSCs. Clinical scale of passive EAE during treatment with 0.5x10<sup>6</sup> MSCs inoculated on the days indicated or with daily treatment with 50 mg/kg CBD in combination with 0.5x10<sup>6</sup> MSCs. The values given represent the mean ± standard error of the mean. Statistical analysis performed using ANOVA and Tukey test. Values \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 were considered statistically significant.

## CONCLUSIONS

MSCs reduced clinical signs *in vivo*, diminishing neuro-inflammation and infiltration in at-EAE, concurrently with a modulation in viability and cytokine production in encephalitogenic cells *in vitro*. The CBD influence on IL-6 cytokine production might be related to the therapeutic effect shown in the concomitant *in vivo* treatment. The beneficial effect of the combination of CBD and cellular therapy might open new possibilities for the treatment of multiple sclerosis.

## REFERENCES

- Sánchez AJ, et al. Clin Immunol 2012; 142:57-76
- González C, et al. Exp Neurol, 2017; 298: 57-67

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to GW Pharmaceuticals for providing CBD. This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria FISPI12/02672 and PI15/02099 integrated in the Plan Nacional de I+D+I (2008-2011 and 2013-2016 respectively), supported by the ISCIII-subdirección General de Evaluación and co-financed by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).





**Neuroimmunology Unit**

## Evaluation of cannabidiol in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis



**Instituto de Salud Carlos III**

Coral González-García<sup>1</sup>, Irene Moreno Torres<sup>1</sup>, Ruth García-Hernández<sup>1</sup>, Lucía Campos Ruiz<sup>1</sup>, Luis Rodríguez Esparragoza<sup>1</sup>, María José Coronado<sup>2</sup>, Aranzazu García-Grande<sup>3</sup>, Juan Antonio García-Merino<sup>1</sup> and Antonio J Sánchez-López<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Neuroimmunology, Majadahonda, Spain (1) - Instituto Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Confocal Microscopy, Majadahonda, Spain (2)  
<sup>3</sup>Instituto Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Flow Cytometry Unit, Majadahonda, Spain (3)

### INTRODUCTION AND PURPOSE

Multiple sclerosis (MS) is the most common demyelinating disorder of the central nervous system (CNS) and is characterized by infiltration of inflammatory leukocytes into CNS followed by demyelination and axonal loss.

Cannabidiol (CBD) is one of the most important compounds of *Cannabis sativa* devoid of psychotropic effects with a plethora of therapeutic properties. It has been able to alleviate the clinical signs in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice model.

The aim of this study is to analyze the relative efficacy of CBD in adoptively transferred EAE (at-EAE), a model that allows a better delineation of the effector phase of EAE.

### METHODS

#### At-EAE induction

Lymph nodes and spleen cells from active EAE-MOG<sub>35-55</sub> C57BL/6 mice were primed 72h with MOG<sub>35-55</sub> (25µg/ml) and IL-12 (25ng/ml) and transferred (20 x 10<sup>6</sup> cells) intraperitoneally (i.p.) to naive mice.

#### Treatment, neurological assessment and Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Mice were divided into two groups: at-EAE, at-EAE+CBD (50 mg/kg). CBD (GW Pharma) solution was prepared following manufacturer's instructions and injected daily i.p.

Disease score was evaluated as follows: 0, asymptomatic; 1, partial loss of tail tonicity or soft weakness in hind limbs; 2, tail paralysis or mild weakness in hind limbs; 3, hind limb weakness or ataxia; 4, partial hind limb paralysis and ataxia; 5, total hind limb paralysis; 6, moribund.

Apparent diffusion coefficient (ADC) was calculated from MRI of mice brains and analysis was performed using Image-J software of ROI (regions of interest) selected area.

#### Histology

For immunofluorescence were used the following antibodies: anti-CD3 (Abcam; 1:20) for T cell infiltrates; F4/80 (Abcam 8MB clone) for macrophage infiltrates; SMI-32 (Abcam) for non-phosphorylated neurofilaments; MBP (Abcam) for myelin basic protein; Iba-1 (Wako) for microglia; anti-GPR55 (Abcam) for GPR55 receptor; anti-CB1 (Abcam) for CB1 receptor; anti-CB2 (Abcam) for CB2 receptor and To-Pro (Invitrogen) for the cellular nuclei.

Spleen cells viability, IL-6 production, apoptosis and reactive oxygen species (ROS) determination.

Cell viability was measured by MTT assay in encephalitogenic cells (0.3 x 10<sup>6</sup>) incubated with MOG<sub>35-55</sub>, IL-12 and CBD (1, 5 and 10µM) or vehicle (ethanol). Pre-treatment with the antagonists of CB1 (SR141716; SR1; Sanofi) or CB2, (SR144528; SR2; Cayman) or agonist of GPR55 (Lysophosphatidylinositol; LPI; Sigma), was 15-30 minutes before CBD addition. Vehicle control was expressed as 100%.

Cell conditioned media from viability assays was collected after 48 h and analyzed for IL-6 by ELISA (R&D Systems). Vehicle control was expressed as 100%.

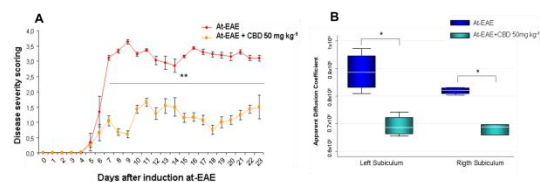
Encephalitogenic splenocytes (5 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated with CBD (5 and 10 µM) or vehicle, 24 and 6h for apoptosis and ROS determination respectively. Early apoptosis was determined by flow cytometry with Annexin-V assay. Splenocytes were pre-loaded with DCF-DA (Sigma; 20 µM) and cell fluorescence was measured by confocal microscopy. Vehicle control was expressed as 1.

#### Statistical analysis

Clinical scores were presented as the mean ± SEM. ANOVA followed by Tukey test was used. \* P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 were considered statistically significant. Kruskal Wallis test and Mann-Whitney U test for post-hoc analyses were performed for *ex vivo* and *in vitro* assays. The significance level was set at 0.05. Bonferroni correction was applied in multiple comparisons.

### RESULTS

• CBD daily injected induced a highly significant suppression of clinical signs (Figure 1A). In parallel ADC value was significantly reduced at brain subiculum area in CBD group (Figure 1B).

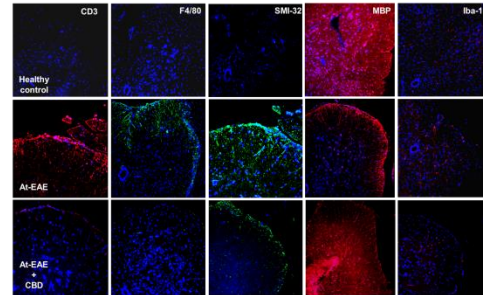


**Figure 1. CBD ameliorated the clinical signs of at-EAE mice and partially reduced ADC in brain subiculum area of treated mice.** (A) Graph shows the clinical score progression of at-EAE mice and CBD treatment until day 23. Disease score was presented as the mean ± SEM. (B) ADC levels were calculated from MRI acquired 17 days of disease course from mice brains. Four mice with at-EAE or treated with CBD were analyzed and represented the median and percentiles 25 and 75. \*p<0.05 and \*\*\*p<0.001 were considered statistically significant.

### ACKNOWLEDGEMENTS

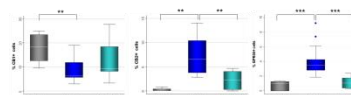
This work was mostly supported by grants from Novartis (P1110/13 JGM-INM2014-01) and Fondo de Investigación Sanitaria FISPI12/02672 and P115/02099 integrated in the Plan Nacional de I+D+i (2008-2011 and 2013-2016 respectively), supported by the ISCIII-subdirección General de Evaluación and co-financed by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). It was also supported by Genzyme Pharma (Project: 23379).

• Immuno-staining of the lumbar area sections showed an increased signal of CD3, F4/80, SMI-32 and Iba-1 indicating infiltration, axonal damage and microglia activation respectively in spinal cord of at-EAE mice compared to controls. CBD effectively decreased CD3 and F4/80 infiltration, SMI-32 axonal damage and Iba-1 microglia expression. Demyelination found in at-EAE group was prevented by CBD treatment (Figure 2).



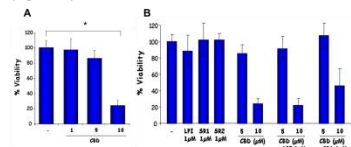
**Figure 2. CBD treatment reduced infiltration, axonal damage, demyelination and microglia reactivity.** Immunofluorescence images of the lumbar spinal cord sections from healthy mice, at-EAE mice, and at-EAE mice treated with CBD at day 24 post mortem. To-Pro (Blue); nuclei; CD3: T lymphocytes; F4/80: Macrophages; SMI-32: non-phosphorylated neurofilaments; MBP: myelin basic protein and Iba-1: Microglia. Representative images (20x) from a mouse of each group are shown.

• CB1, CB2 and GPR55 receptors expression analyzed by immunofluorescence in lumbar spinal cord sections showed a decreased signal in CB1 and an elevated expression in CB2 and GPR55 in at-EAE mice compared to healthy controls. These values were almost restored to healthy control levels in CBD treated group (Figure 3).



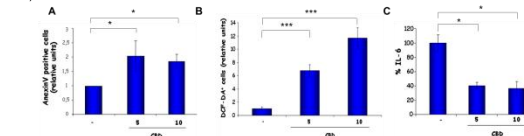
**Figure 3. CBD reduced CB2 and GPR55 expression in lumbar spinal cord from at-EAE mice.** Graphs represent the percentage of CB1, CB2 or GPR55 positive cells quantified from confocal microscopy images of the lumbar spinal cord sections from healthy mice, at-EAE mice, and at-EAE mice treated with CBD at day 24 post mortem. Analysis was performed in four different areas per section of each mouse (n=4 mice). Differences with \*p<0.01 or \*\*\*p<0.001 were considered statistically significant.

• High doses of CBD reduced the viability of encephalitogenic spleen cells activated *in vitro* (Figure 4A). The use of SR141716 and SR144528 (CB1 and CB2 receptor antagonists, respectively) or LPI (endogenous ligand of GPR55) did not allow to reverse the effect of CBD (Figure 4B).



**Figure 4. CBD reduced encephalitogenic spleen cells viability independently of GPR55, CB1 or CB2 receptors.** (A) MTT proliferation assay of encephalitogenic spleen cells, was developed in cultures activated with MOG<sub>35-55</sub> and IL-12 for 48h in presence or absence of CBD. (B) Pre-incubation with CB1-CB2 antagonists (SR1-SR2) or GPR55 agonist (LPI) 15-30 minutes before CBD addition was assayed with MTT at 48h. MTT test corresponds to three experiments with triplicates. \*p<0.05 was considered statistically significant.

• *In vitro* cultures of activated encephalitogenic cells underwent an increase of early apoptosis with CBD at 5 and 10µM (Figure 5A). Furthermore, encephalitogenic cells also showed an increase of ROS (DCF-DA positive cells) (Figure 5B) and a reduction of IL-6 production (Figure 5C) after CBD incubation.



**Figure 5. CBD increased early apoptosis, ROS production and reduced IL-6 production in encephalitogenic spleen cells.** (A) Early apoptosis was measured by flow cytometry in encephalitogenic spleen cells after 24h of activation and incubation in presence or absence of 5 or 10µM of CBD. Graph is presented as relative units of Annexin V positive, DAPI negative cells of four independent experiments. (B) Pre-loaded encephalitogenic cells with DCF-DA and incubated with CBD or vehicle for 6h. Graph represents mean of two experiments with quadruplicates. (C) Cell conditioned media from viability assays at 48h was analyzed for IL-6 by ELISA. Graph represents mean of three experiments with triplicates. \*p<0.05, \*\*p<0.01 or \*\*\*p<0.001 were considered statistically significant.

### CONCLUSIONS

- Preventive CBD (50mg/kg) treatment significantly decreased at-EAE clinical score and reduced brain subiculum ADC.
- CBD effectively decreased infiltration, axonal damage, demyelination and microglia activation occurred in at-EAE.
- CBD enhanced CB1, reduced CB2 and GPR55 expression in lumbar spinal cord from at-EAE mice.
- CBD reduced encephalitogenic spleen cells viability, independently of GPR55, CB1 or CB2 receptors.
- CBD increased early apoptosis and ROS production in parallel to an IL-6 decrease in encephalitogenic spleen cells.



# Cannabinoid mechanisms in the treatment of adoptively transferred EAE



C González-García<sup>1</sup>, A García-Merino<sup>1</sup>, L Campos Ruiz<sup>1</sup>, IP Moreno Torres<sup>1</sup>, R García Hernández<sup>1</sup>, MJ Coronado Albi<sup>2</sup>, A García Grande<sup>3</sup>, L Rodríguez Esparragoza<sup>1</sup>, AJ Sánchez-López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University Hospital Puerta de Hierro Research Institute, Neuroimmunology, Majadahonda, Madrid, Spain. <sup>2</sup>University Hospital Puerta de Hierro Research Institute, Confocal Microscopy Unit, Majadahonda, Madrid, Spain. <sup>3</sup>University Hospital Puerta de Hierro Research Institute, Flow Cytometry Unit, Majadahonda, Madrid, Spain.

## Introduction and Purpose

Cannabinoid (CBD), the major non-psychoactive plant derived cannabinoid, has been reported to bind cannabinoid receptors (CB1-CB2) with weak affinity. It shares with 'classic' psychocannabinoids many beneficial effects, including anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Due to the lack of psychotropic effects, CBD is currently under intensive investigation. Although CBD treatment was reported to decrease severity in active EAE model, little has been elucidated about the effector phase of the disease. Consequently, we designed this study to evaluate the potential of non-psychoactive CBD in adoptively transferred EAE and elucidate its mechanisms of action *in vitro*.

## Methods

### Encephalitogenic cells and at-EAE induction

Single cell suspensions ( $5 \times 10^6$  cells/ml) of lymph nodes and spleen from active EAE-MOG<sub>35-55</sub> mice, were cultured in supplemented DMEM medium. Cells were primed 72h with MOG<sub>35-55</sub> (25µg/ml) and IL-12 (25ng/ml) and transferred ( $20 \times 10^6$  cells) intraperitoneally (i.p.) to naive mice.

### Treatment and neurological assessment

Two groups of 5-7 mice were used: at-EAE (vehicle: solutol, ethanol and PBS (phosphate-buffered saline), v:v:v 1:1:8), at-EAE+CBD (50 mg/kg). CBD was injected i.p. immediately after at-EAE induction. CBD (GW Pharma) solution was prepared following manufacturer's instructions. Mice were daily assessed until 22 days after the immunization. Disease score: 0, asymptomatic; 1, partial loss of tail tonicity or soft weakness in hind limbs; 2, tail paralysis or mild weakness in hind limbs; 3, hind limb weakness or ataxia; 4, partial hind limb paralysis and ataxia; 5, total hind limb paralysis; 6, moribund. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Brain MRI measurements were performed using 7-Tesla (7-T Bruker Pharmascan) at day 17 of disease progression. Quantitative T2 maps and apparent diffusion coefficient (ADC), were calculated. Analysis was performed by J-Image software of ROI selected areas in brain.

### Inflammatory cell infiltration

Lumbar spinal cords obtained at day 22 postinoculation and fixed in paraformaldehyde were included in OCT (Tissue-Tek Sakura) and cryosectioned for immunostaining. For immunofluorescence determination, anti-CD3 (Abcam; 1:20) for T cell infiltrates and F4/80 (Abcam; 1:10) for macrophages infiltrates were used in cryosections of 8µm.

### Spleen cell viability

Cells ( $0.3 \times 10^6$ ) were incubated with MOG<sub>35-55</sub> (25µg/ml) and IL-12 (25ng/ml) and with or without CBD (1, 5 and 10µM). Pre-treatment with the antagonists of CB1 (SR141716; SR1; Sanofi) or CB2, (SR144528; SR2; Cayman) or agonist of GPR55 (Lysophosphatidylinositol; LPI; Sigma), was 15-30 minutes before CBD addition. After 48 hours MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2-2', 5'-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma - Aldrich) assay was measured by spectrophotometer Multiskan ex (Thermo Electron Corporation). Vehicle control was expressed as 100%.

### CB1, CB2 and GPR55 receptor expression

Determination of CB1, CB2 or GPR55 receptors was performed with anti-CB1, anti-CB2 and anti-GPR55 from Abcam. After 36 hours of activation with MOG<sub>35-55</sub> (25µg/ml) and IL-12 (25ng/ml) receptors were measured by confocal microscopy in TCS SP5 Leica microscope (Wetzlar, Germany).

### Apoptosis and Reactive oxygen species (ROS) determination.

Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with CBD (5 and 10 µM) or vehicle (ethanol) for 24 h. Annexin V-fluorescein isothiocyanate (annexin V-FITC; BD) and blue-fluorescent DAPI dihydrochloride (4',6-diamidino-2-phenylindole) solutions were added following the manufacturer's instructions. Early apoptosis was presented as relative units of Annexin-V positive DAPI negative cells, with vehicle control expressed as 1. Data were analyzed using the software MacsQuantify, Miltenyi Biotec.

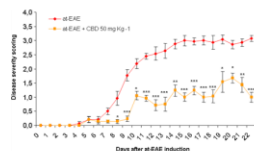
Splenocytes loaded with DCF-DA (20 µM) were cultured ( $5 \times 10^6$  cells/ml) and treated with CBD (5 and 10µM) or vehicle (ethanol) for 6h. ROS levels were presented as relative units of DCF-DA positive cells, with vehicle control expressed as 1. Cell fluorescence was measured by confocal microscopy in TCS SP5 Leica microscope (Wetzlar, Germany).

### Statistical analysis

Clinical disease scores were presented as the mean  $\pm$  SEM. Differences were analyzed using ANOVA followed by Tukey test. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  were considered statistically significant. Descriptive analysis for *ex vivo* and *in vitro* assays was performed obtaining the absolute and relative frequencies for categorical variables and the mean and standard deviation or median and percentiles 25 and 75, in numeric variables. Kruskal Wallis test (more than two groups) and Mann-Whitney U test for pos- hoc analyses (between two groups) were performed. The significance level was set at 0.05. Bonferroni correction was applied in multiple comparisons. Statistical analysis was performed with Stata / IC v.14.1 package, (StataCorp 2015. Stata Statistical Software, Release 14. College Station, TX: Stata Corp LP).

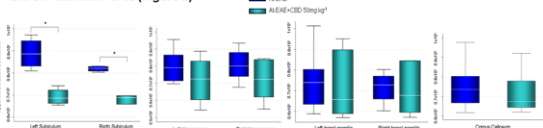
## Results

•Compared to control at-EAE mice, CBD treatment (50mg/kg/day) induced a highly significant suppression of clinical signs (Figure 1).



**Figure 1. CBD ameliorated the clinical signs and disease progression in at-EAE.** At-EAE was induced in male mice inoculated with  $20 \times 10^6$  cells from active EAE mice, previously activated with MOG and IL-12 during 72h. CBD was injected daily 50 mg/kg and clinical disease scores were recorded each day until day 22. Disease score was presented as the mean  $\pm$  SEM. ANOVA and Tukey post-test were used to statistical analyses. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  were considered statistically significant.

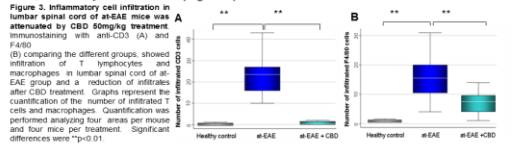
•Reduction in clinical signs due to CBD treatment, correlated with a mild decrease of Apparent diffusion coefficient (ADC) values in different brain zones. ADC value differences only were significant at brain subiculum area (Figure 2).



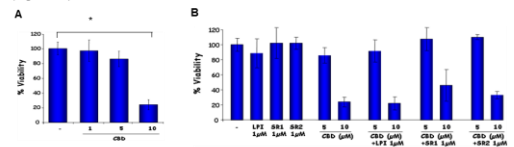
**Figure 2. Minor ADC level was found in brain subiculum of CBD compared to untreated group.** MRI was performed at 7 T on a Bruker imaging system. MRI measurements were acquired 17 days after disease induction and 1 day after CBD treatment of four mice with at-EAE disease or treated with CBD (50mg/kg). were analyzed and represented the median and percentiles 25 and 75. Quantification of the ADC values was analyzed in subiculum basal ganglia, hippocampus and corpus callosum. Significant differences only was found in the brain subiculum of CBD treated mice, compared to the at-EAE group. \* $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

•Quantification of infiltrated T cells and macrophages in lumbar spinal cord sections showed the presence of both type of cells in at-EAE group and a reduction of these infiltrates, mainly in T cells, caused by CBD treatment (Figure 3).

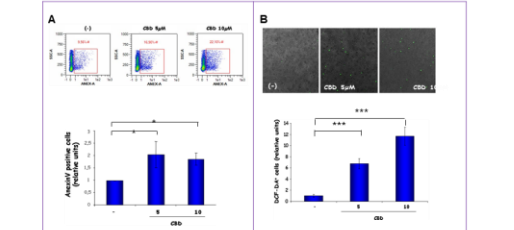


•High doses of CBD for 48h reduced the viability of encephalitogenic spleen cells activated *in vitro* (Figure 4A). This decrease in viability neither was through GPR55 nor cannabinoid receptors CB1- CB2. The use of SR141716 and SR144528 (CB1 and CB2 receptor antagonists, respectively) or LPI (endogenous ligand of GPR55) not allowed to reverse the effect of CBD (Figure 4B). Auto- reactive spleen cells activated with MOG e IL-12 for 36h showed expression of cannabinoid receptors that was determined by confocal microscopy (Figure 4C).



**Figure 4. CBD reduced encephalitogenic spleen cells viability.** Independently of GPR55, CB1 or CB2 receptors. (A) MTT proliferation assay of spleen cells isolated from EAE-MOG<sub>35-55</sub> induced mice, showed a decreased viability in *in vitro* cultures incubated with CBD. It was evaluated after incubation with MOG<sub>35-55</sub> and IL-12 for 36h in presence or absence of increasing indicated concentrations of CBD (µM). (B) Pre-incubation with CB1-CB2 antagonists (SR1-SR2) or GPR55 agonist (LPI) 15-30 minutes before CBD addition not restored normal viability in 10µM CBD cultures at 48h. (C) Encephalitogenic spleen cells activated and immunostained with anti-CB1 or GPR55 showed presence of the receptors after 36h of activation. Images 20x. Viability assays correspond to three experiments with triplicates where activated spleen cells control without CBD treatment is expressed as 100%.

•CBD is able to increase significantly early apoptosis in activated encephalitogenic spleen cells cultured with 5 or 10µM of CBD for 24h (Figure 5A). Apoptosis could be involved in the decrease of cells viability. Reactive species of oxygen (ROS) were significant increased in auto-reactive spleen cells after activation and incubation with 5 or 10µM of CBD during 6h (Figure 5B).



**Figure 5. CBD increased early apoptosis and ROS production in encephalitogenic spleen cells.** Analysis of early apoptosis by flow cytometry with Annexin V in encephalitogenic spleen cells, after 24h of activation, showed an increased relative apoptosis at 5 or 10µM compared to vehicle control. Upper panel shows cytometry plots while bottom panel shows relative units of apoptosis. In early apoptosis with CBD treatment compared to vehicle without CBD. (B) Pre-treated encephalitogenic cells with DCF-DA and incubated with CBD (5 or 10µM) or vehicle both showed by confocal microscopy, an increased production of ROS. Upper panel shows microscopy pictures showing DCF-DA positive cells at different production of ROS. Upper panel shows microscopy pictures showing DCF-DA positive cells at different production of ROS. Bottom panel shows quantification of the number of positive DCF-DA cells. Bottom graph represents the mean  $\pm$  SD of four independent experiments. In case of DCF-DA are represented the mean of two experiments with quadruplicates and measured four sections of each well. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  were considered statistically significant.

## Conclusions

•Compared to control at-EAE C57BL/6 mice, CBD ameliorated significantly clinical signs of the disease, in concordance with a decrease in T cell and macrophages infiltration.  
•MRI analysis from at-EAE mice revealed minor ADC levels in brain subiculum produced by CBD treatment.  
•Incubation of encephalitogenic spleen cells *in vitro* with high dosage of CBD decreased viability in the culture, increasing early apoptosis and ROS production.  
•These *in vitro* effects mediated by CBD contributes to the mechanisms of action through which CBD exerts its beneficial effects in the disease. It can be a suitable agent for MS due to the lack of psychoactive effects and considering its efficacy in the induction and effector phases of the disease.

## Acknowledgements


This work was mostly supported by grants from Novartis (PI110/13 JGM-INM2014-01) and Fondo de Investigación Sanitaria FIS PI12/02672 and PI15/02099 integrated in the Plan Nacional de I+D+i (2008-2011 and 2013-2016 respectively), supported by the ISCIII-subdirección General de Evaluación and co-financed by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Payment for travel and inscription expenses was supported by Novartis.

## References

-Dittel et al. British Journal of Pharmacology (2008) 153, 271-276  
-Hsin-Ying Wu et al. Toxicology and Applied Pharmacology (2008) 226, 260-270  
-Kozela et al. British Journal of Pharmacology (2011) 163, 1507-1519  
-Kurkowska-Jastrzebska et al. Neuroscience (2013) 248, 690-698  
-Chiriac et al. International Immunology (2014) 27, 3, 153-160  
-N. Nathoo et al. NeuroImage: Clinical 4 (2014) 743-756




## ANEXO 2: Autorización del proyecto por la CAM




CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,  
ADMINISTRACIÓN LOCAL  
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

**Comunidad de Madrid**



Ref: 10/228224.9/15 Fecha: 13/11/2015 11:58



Cons. Medio Amb. Admon. Local y O.T.  
Reg. C. Medio Amb. Adm. Local y O.T. (ALC)  
Destino: Juan Antonio García Merino

Vista la solicitud presentada por JUAN ANTONIO GARCÍA MERINO, para la autorización del proyecto de memoria técnica titulada **CÉLULAS MESENQUIMALES Y ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE): PATRONES DE CIRCULACIÓN CELULAR Y EFECTO DE CANNABIDIOL**; a desarrollar en el centro usuario HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA con código de registro ES280900000012 y siendo el responsable del proyecto JUAN ANTONIO GARCÍA MERINO.

Visto el informe del Área de Protección Animal.


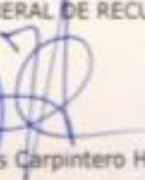
Considerando que el citado proyecto se ajusta a lo establecido en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: autorizar la realización del proyecto referenciado siempre que se mantengan las condiciones que dieron lugar a la autorización y que el personal que intervenga tenga la preparación y formación adecuada que se especifica en el citado Real Decreto.

Tal y como se establece en el informe de evaluación aportado, este proyecto no deberá ser sometido a la realización de una evaluación retrospectiva.

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, conforme a lo establecido en el artículo 114.1 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común.

Madrid, 11 de noviembre de 2015.  
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA  
P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015  
EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS

Fdo.: Jesus Carpintero Hervás

Ref PROEX 318/15